

**Charakterisierung der
Kaliumkanal- α -Untereinheiten
AtKC1 und KAT2 aus
*Arabidopsis thaliana***

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Alexander Szyroki
aus Vechta

Köln 2002

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. S. Waffenschmidt
 Prof. Dr. U.-I. Flügge
 Prof. Dr. K. Palme

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juni 2002

KEINE TAT KEIN WORT KEIN GEDANKE GEHT VERLOREN
ALLES BLEIBT UND TRÄGT FRÜCHTE

Meinem Vater
und
meiner Mutter
in Liebe und Dankbarkeit
zugeeignet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	v
1 Einleitung.....	1
1.1 Übersicht über die K⁺-Kanal-Familien.....	3
1.2 Die pflanzlichen 6TM1P-K⁺-Kanal-α-Untereinheiten.....	7
1.2.1 Struktur der K ⁺ -Kanal- α -Untereinheiten.....	7
1.2.2 K ⁺ -Kanal-Interaktionen.....	12
1.2.3 Die Mitglieder der pflanzlichen 6TM1P-Familie.....	15
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	17
 2 Material und Methoden.....	 19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Pflanzen.....	19
2.1.2 Insektenzellen.....	19
2.1.3 Bakterien.....	19
2.1.4 Vektoren.....	20
2.1.5 Enzyme.....	20
2.1.6 Chemikalien.....	20
2.1.7 Filter und Membranen.....	21
2.1.8 Filmmaterial.....	21
2.1.9 Geräte.....	22
2.1.10 Datenverarbeitung.....	22
2.1.11 Kulturmedien.....	23
2.1.11.1 Bakterienmedien.....	23
2.1.11.2 Insektenzellkulturmedien.....	23
2.1.11.3 Pflanzenmedien.....	24
2.1.12 Antibiotika, Stammlösungen.....	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 DNA Präparationen.....	25
2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
2.2.1.2 Isolierung von Bacmid-DNA aus <i>E. coli</i> DH10Bac.....	25
2.2.1.3 Isolierung von genomischer Pflanzen-DNA für Southernblot-Analysen.....	26
2.2.1.4 Isolierung von genomischer Pflanzen-DNA für PCR.....	26
2.2.2 RNA Präparation.....	26
2.2.2.1 Isolierung von Poly (A ⁺) RNA.....	26
2.2.3 Protein Präparationen.....	27
2.2.3.1 Präparation mikrosomaler Proteine aus <i>A. thaliana</i>	27
2.2.4 Methoden zur Konzentrationsbestimmung.....	27
2.2.4.1 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration.....	27
2.2.4.2 Bestimmung der Protein-Konzentration.....	27

2.2.5 Enzymatische Reaktionen	28
2.2.5.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	28
2.2.5.2 Dephosphorylierung von DNA	28
2.2.5.3 Auffüllreaktionen	29
2.2.5.4 Ligation von DNA-Fragmenten	29
2.2.5.5 Radioaktive Markierung von DNA	29
2.2.5.6 DNA-Sequenzierung	29
2.2.5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
2.2.5.8 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	32
2.2.6 Gelelektrophoretische Methoden	33
2.2.6.1 Auftrennung von DNA und Isolierung von Fragmenten	33
2.2.6.2 Auftrennung von RNA	33
2.2.6.3 Auftrennung von Proteinen und Färbung	33
2.2.7 Blotten von Nukleinsäuren und Proteinen	34
2.2.7.1 Southernblot	34
2.2.7.2 Blotten von PCR-Produkten	35
2.2.7.3 Northernblot	35
2.2.7.4 Westernblot	35
2.2.8 Nachweis filtergebundener Signale	35
2.2.8.1 Southernblot Hybridisierung	35
2.2.8.2 Northernblot-Hybridisierung	36
2.2.8.3 Immunfärbung filtergebundener Proteine	36
2.2.9 Transformationsmethoden	36
2.2.9.1 Präparation elektrokompeter <i>E. coli</i> Zellen	36
2.2.9.2 Präparation kompetenter <i>E. coli</i> DH10Bac Zellen	37
2.2.9.3 Bakterientransformation (Elektroporation)	37
2.2.9.4 Transformation von <i>E. coli</i> DH10Bac Zellen	37
2.2.9.5 Transiente Transformation von BY2 Tabak-Protoplasten	37
2.2.9.6 Pflanzentransformation	39
2.2.10 Kultivierung von <i>A. thaliana</i> Pflanzen	40
2.2.10.1 Oberflächensterilisation	40
2.2.10.2 Herstellung von Wurzelkulturen	40
2.2.11 Qualitative Bestimmung der GUS-Aktivität	40
2.2.12 Immuncytochemie	41
2.2.12.1 Herstellung eines polyklonalen anti-AtKC1-Antikörpers	41
2.2.12.2 Immuncytochemie an intakten Pflanzen	42
2.2.12.3 Immuncytochemie an Insektenzellen	42
2.2.12.4 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	43
2.2.13 Insektenzellkultur und Herstellung rekombinanter Baculoviren	43
2.2.13.1 Insektenzellkultur (mit Zellzahlbestimmung)	44
2.2.13.2 Anlegen und Auftauen von Insektenzell-Stammlösungen	45
2.2.13.3 Transfektion von Insektenzellen mit Bacmid-DNA	45
2.2.13.4 Herstellung der Hochtiter-Virusstammlösungen	46
2.2.13.5 Bestimmung des viralen Titers (Plaque-Assay)	46
2.2.14 Elektrophysiologische Methoden	46
2.2.14.1 <i>patch clamp</i> -Analyse an Sf9-Zellen	49
2.2.14.1 <i>patch clamp</i> -Analyse an <i>X. laevis</i> Oozyten	50

3 Ergebnisse	53
3.1 Charakterisierung der Kaliumkanal-α-Untereinheit AtKC1	53
3.1.1 Subzelluläre Lokalisation des AtKC1-Proteins	53
3.1.1.1 Westernblot-Analysen von Membranfraktionen	53
3.1.1.2 Homologe Expression in <i>A. thaliana</i>	55
3.1.2 Heterologe Expression von AtKC1	56
3.1.2.1 Expression in Sf9-Insektenzellen	56
3.1.2.1.1 Expression von AtKC1	56
3.1.2.1.2 Expression von Signalpeptid-Fusionsproteinen und Deletionsmutanten	59
3.1.2.2 Expression in BY2-Tabaksuspensionszellen	59
3.1.3 Charakterisierung von AtKC1- <i>knockout</i> -Mutanten	65
3.1.3.1 Identifizierung einer <i>En-1</i> -Insertions-Mutante	66
3.1.3.2 Southernblot-Analyse	68
3.1.3.3 RT-PCR-Analyse	70
3.1.3.4 Identifizierung einer <i>footprint</i> -Mutante	71
3.1.3.5 Westernblot-Analyse	72
3.1.4 Elektrophysiologische Untersuchungen	74
3.1.5 Phänotyp-Analyse der <i>Atkc1-f</i> -Pflanzenlinie	77
3.2 Charakterisierung der Kaliumkanal-α-Untereinheit KAT2	81
3.2.1 Isolierung der <i>KAT2</i> -cDNA	81
3.2.1.1 Herstellung von <i>KAT2</i> überexprimierenden Pflanzenlinien	81
3.2.1.2 Klonierung der <i>KAT2</i> -cDNA	84
3.2.2 Elektrophysiologische Untersuchungen	84
3.2.2.1 Expression in Sf9-Zellen	84
3.2.2.2 Expression in <i>X. laevis</i> Oozyten	85
3.2.3 Untersuchungen zur Aktivität des <i>KAT2</i> -Promotors	90
4 Diskussion	93
4.1 Arbeiten zur Lokalisation und Funktion von AtKC1	93
4.1.1 Lokalisation von AtKC1	93
4.1.2 Funktion von AtKC1	96
4.2 Arbeiten zur Lokalisation und Funktion von KAT2	102
4.2.1 Lokalisation von KAT2	102
4.2.2 Funktion von KAT2	105
4.3 Ausblick	110
5 Zusammenfassung	113

6 Anhang	115
6.1 Vektorkarten	115
6.2 Expressionsdaten der 6TM1P-Kaliumkanal-α-Untereinheiten	118
6.3 Daten zur funktionellen Charakterisierung der klonierten 6TM1P-Kaliumkanal-α-Untereinheiten	119
7 Literatur	121

Abkürzungsverzeichnis

K ⁺ -Kanäle			Acc. No.	Gen
AKT1	<i>A. thaliana</i> <u>K</u> ⁺ -transporter	Sentenac <i>et al.</i> , 1992	X62907	At2g26650
AKT2	<i>A. thaliana</i> <u>K</u> ⁺ -transporter	Cao <i>et al.</i> , 1995b	U40154	At4g22200
AKT3	<i>A. thaliana</i> <u>K</u> ⁺ -transporter	Ketchum und Slayman, 1996	U44745	At4g22200
AKT6	<i>A. thaliana</i> <u>K</u> ⁺ -transporter	MIPS <i>A. thaliana</i> Database	AL034567	At4g32500
AtKC1	<i>A. thaliana</i> <u>K</u> ⁺ -channel	Küch, 1994	U812398	At4g32650
GORK	Guard cell outward rectifying <u>K</u> ⁺ -channel	Ache <i>et al.</i> , 2000	AJ279009	At5g37500
KAT1	<u>K</u> ⁺ -channel from <i>A. thaliana</i>	Anderson <i>et al.</i> , 1992	M86990	At5g46240
KAT2	<u>K</u> ⁺ -channel from <i>A. thaliana</i>	Pilot <i>et al.</i> , 2001	AJ288900	At4g18290
SKOR	Stelar <u>K</u> ⁺ outward rectifier	Gaymard <i>et al.</i> , 1998	AJ223358	At3g02850
SPIK	Shaker pollen inward <u>K</u> ⁺ rectifier	Mouline <i>et al.</i> , 2002	AJ309323	At2g25600
KDC1	<u>K</u> ⁺ -channel from <i>D. carota</i>	Downey <i>et al.</i> , 2000	AJ249962	
KST1	<u>K</u> ⁺ -channel from <i>S. tuberosum</i>	Müller-Röber <i>et al.</i> , 1995	X79779	

In der vorliegenden Arbeit beziehen sich kursiv dargestellte Abkürzungen auf die Nukleotidsequenz (Unterscheidung zwischen Gen, RNA, cDNA und Promotor erfolgt durch einen entsprechenden Zusatz), nicht kursive Abkürzungen beziehen sich auf die Proteine. Die Gene kodieren nicht die nativen Kanäle, sondern α -Untereinheiten der Kanäle. Die Bezeichnung "Kanäle" wird in vielen Fällen synonym für die nativen Kanäle und die α -Untereinheiten verwendet; die Bedeutung geht aber aus dem Zusammenhang hervor. In den Kapiteln, in denen eine Unterscheidung zwischen den Begriffen wichtig ist, z. B. bei der Bildung von Kanälen aus verschiedenen α -Untereinheiten, wird der Zusatz " α -Untereinheit" verwendet. In der *patch clamp*-Analyse an nativen Systemen, z. B. Protoplasten von Schließzellen oder Wurzelhaaren, werden ganze Kanalsembles beschrieben, deren genaue Zusammensetzung aus verschiedenen α -Untereinheiten meist unbekannt ist; in diesen Fällen soll auf diesen Umstand besonders hingewiesen werden durch die Bezeichnung "K⁺-Kanalaktivität".

A	Ampere
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
Acc. No.	Zugriffsnummer (<i>Accession number</i>)
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAP	N ⁶ -Benzylaminopurin
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	Adenosin-3', 5' zyklisches Monophosphat
<i>CaMV</i>	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	Guanosin-3', 5' zyklisches Monophosphat
cNBD	Bindestelle für zyklische Nukleotide (<i>cyclic nucleotide binding domain</i>)
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propansulfonat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Tag (<i>day</i>)
<i>D. carota</i>	<i>Daucus carota</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-O', O'-bis(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetat
E _M	Membranpotential
<i>En-1</i>	<i>Enhancer</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
E _{rev}	Umkehrpotential (<i>reversal potential</i>)
F	FARADAY-Konstante (9,6487·10 ⁴ C·mol ⁻¹)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein

Gm	Gentamycin
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde (<i>hour</i>)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (<i>High pressure (purity) liquid chromatography</i>)
I	Stromstärke
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
J	Joule
K	Kelvin
Kan	Kanamycin
$[K^+]_{\text{cyt}}$, $[K^+]_{\text{ex}}$	cytosolische, bzw. extrazelluläre Kaliumkonzentration
$K^+_{\text{in-Strom}}$	Kaliumeinstrom
$K^+_{\text{in-Kanal}}$	einwärtsrektifizierender Kaliumkanal
K_{ir}	Klasse der tierischen, spannungsabhängigen, einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle
K_{v}	Klasse der tierischen, spannungsabhängigen, auswärtsrektifizierenden Kaliumkanäle
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
λ	Wellenlänge
ln	natürlicher Logarithmus (<i>logarithmus naturalis</i>)
log	dekadischer Logarithmus
m	Meter
M	molar ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
MOI	Infektionsüberschuss (<i>multiplicity of infection</i>)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
M_r	relative molekulare Masse
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NaAc	Natriumacetat
NADP^+	Nikotinamidadenin-Dinukleotidphosphat, oxidierte Form
NADPH	Nikotinamidadenin-Dinukleotidphosphat, reduzierte Form
nt	Nukleotid(position)
OD_{600}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ori	Replikationsstartpunkt (<i>origin of replication</i>)
O	Ohm

pA	Polyadenylierungssignal (Terminationssignal)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
pfu	Plaque-bildende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
pH _{cyt} , pH _{ex}	cytosolischer, bzw. extrazellulärer pH-Wert
p. i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
P _i	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R	allgemeine Gaskonstante (8,3143 J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur (25°C)
s	Sekunde
S	Siemens
s. Abb.	siehe Abbildung
SAP	Shrimps Alkaline Phosphatase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
s. o.	siehe oben
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
s. u.	siehe unten
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TM-TPS	N,N ^I ,N ^{II} ,N ^{III} -Tetramethyl-N,N ^I ,N ^{II} ,N ^{III} -tetrapalmitylspermin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>); Spannung
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
ü. N.	über Nacht
V	Volt
<i>V. faba</i>	<i>Vicia faba</i>
vgl.	vergleiche
vir-	rekombinanter Baculovirus
Vol	Volumeneinheit
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit

wt	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit (<i>weight per volume</i>)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galacto-pyranosid
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronsäure
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
z	Ionenvaleanz
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Nukleotide

dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-triphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat

Im übrigen schien mir seine Erklärung so evident, daß meine Schmach, nicht von allein darauf gekommen zu sein, rasch wettgemacht wurde durch meinen Stolz, nun teilzuhaben an dieser Erkenntnis, und ich beglückwünschte mich gleichsam selbst zu meinem Scharfsinn.

1 Einleitung

Zellen grenzen sich gegen ihre Umgebung durch Biomembranen ab. Diese bestehen aus einer Lipiddoppelschicht mit integralen sowie peripheren Proteinen. Biomembranen sind für polare und geladene Teilchen nahezu undurchlässig. Diese Substanzen, z. B. Metabolite oder Ionen, können nur mit Hilfe spezieller, teilweise energieverbrauchender Transportsysteme in das Zellinnere oder aus der Zelle heraus gelangen. Dadurch ist es für die Zelle möglich, die ionische Zusammensetzung des Cytoplasmas genau zu kontrollieren. Durch aktive Transportprozesse entstehen Konzentrationsgradienten zwischen dem Extrazellularraum und dem Cytoplasma, der von der Zelle zudem als Energiespeicher genutzt werden kann.

Der Ionen-transport kann in zwei Klassen unterteilt werden (s. Abb. 1.1; Alberts *et al.*, 1989): Aktiver Ionen-transport wird von Carriern und Ionenpumpen vermittelt. Ein gelöster Stoff wird dabei unter Energieverbrauch transportiert und kann dadurch auch gegen seinen Konzentrationsgradienten transportiert werden. Ionenpumpen, wie z. B. H^+ -ATPasen, nutzen die Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat. Carrierproteine koppeln den energieverbrauchenden an einen energieliefernden Transport. Dabei können Ionen in gleicher (Symporter) oder entgegengesetzter Richtung (Antiporter) durch reversible Konformationsänderung der Carriers transportiert werden. Passiver Transport wird auch als “Erleichterte Diffusion” bezeichnet und wird von Uniportern und vor allem Ionenkanälen vermittelt.

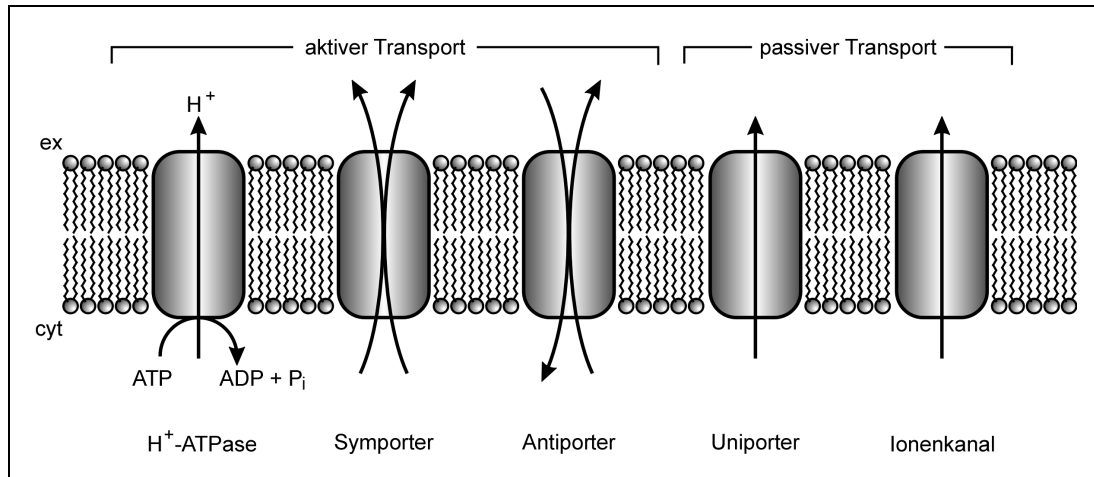


Abbildung 1.1. Schematische Darstellung der unterschiedlichen Membrantransportsysteme. Der aktive Transport wird von ATPasen, Symportern und Antiportern, der passive Transport von Uniportern und Ionenkanälen vermittelt.

Die Triebkraft für den Transport eines bestimmten Ions durch einen geöffneten Ionenkanal wird durch das elektrochemische Potential beschrieben. Dieses setzt sich zusammen aus der elektrischen Potentialdifferenz zwischen Zellinneren und -äußeren und der Konzentrationsdifferenz für dieses bestimmte Ion. Jenes Membranpotential (E_M) bei welchem für ein bestimmtes Ion kein Nettoionenfluß stattfindet, wird als Gleichgewichtspotential (E_{Ion}) bezeichnet und ist aufgrund der unterschiedlichen physiologischen Konzentrationsverhältnisse für jedes Ion verschieden. Ist das Membranpotential $E_M < E_{Ion}$ besteht eine “negative” Triebkraft ($E_M - E_{Ion}$), d. h. es erfolgt bei geöffnetem Kanal ein Einstrom des betreffenden Ions in die Zelle.

Als Ruhepotential (E_R) wird dasjenige Membranpotential bezeichnet, bei welchem kein elektrischer Nettogesamtstrom fließt. Änderungen vom Ruhepotential hin zu negativeren Werten werden als Hyperpolarisierung bezeichnet, im umgekehrten Fall als Depolarisierung.

Ionenkanäle zeigen teilweise eine hohe Selektivität für ein spezifisches Ion und werden daher in K^+ -, Na^+ -, Ca^{2+} - und Cl^- -Kanäle eingeteilt. Darüber hinaus gibt es aber auch Mischformen, die recht unselektiv Kationen oder Anionen transportieren.

Die meisten Ionenkanäle werden durch Bindung eines Liganden oder durch Änderung des Membranpotentials aktiviert, d. h. sie öffnen sich. Ligandenbindung kann dabei wie z. B. beim nikotinischen Acetylcholinrezeptor von der extrazellulären Seite her erfolgen, oder wie bei zyklisch Nukleotid-gesteuerten Kanälen vom Cytoplasma her. Spannungsabhängige Kanäle reagieren meistens nur auf Hyper- oder auf Depolarisierungen der Membran.

Daneben gibt es aber auch Kanäle, die sowohl liganden- als auch spannungsgesteuert sind. Die Familie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle stellt die bei weitem größte Gruppe der Ionenkanäle dar.

1.1 Übersicht über die K^+ -Kanal-Familien

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (K_v -Kanäle) können eingeteilt werden in auswärts- und einwärtsgleichrichtende (rektifizierende) Kanäle. Einwärtsgleichrichter öffnen nur unter hyperpolarisierenden Bedingungen, d. h. das Membranpotential sinkt unter das Ruhepotential und K^+ -Ionen können in das Zellinnere einströmen. Entsprechend öffnen Auswärtsrektifizierer unter depolarisierenden Potentialen und die Zelle gibt K^+ ab. Zwischen diesen Extremen sind aber auch K^+ -Kanäle bekannt, die einen K^+ -Strom in beide Richtungen zulassen.

K_v -Kanäle können aus α - und β -Untereinheiten aufgebaut sein, wobei die α -Untereinheiten die eigentliche Ionenpore ausbilden, während die β -Untereinheiten als periphere, modulierende Membranproteine in einer 1:1-Stöchiometrie an die $K_v\alpha$ -Untereinheiten binden, so daß der funktionelle Kanal die Struktur $\alpha_4\beta_4$ aufweist. Durch Röntgenstrukturaufklärung konnte die tetramere Struktur der β -Untereinheiten gezeigt werden (Gulbis *et al.*, 1999): Sie zeigen hohe Homologie zu NADPH-abhängigen Oxidoreduktasen. Es wird spekuliert, daß sie eine redox-sensitive K^+ -Kanal-Regulation vermitteln.

Aufgrund der Transmembrantopologie können die bekannten Kaliumkanal- α -Untereinheiten in 4 große Gruppen eingeteilt werden, wobei 2, 4, 6 oder 8 Transmembrandomänen (TM) und 1 oder 2 Porendomänen (P) vorliegen können (s. Abb. 1.2).

Die größte Gruppe bilden die Mitglieder der α -Untereinheiten mit 6 Transmembrandomänen und einer Porenregion (6TM1P), die in tierischen und pflanzlichen Zellen sowohl Einwärts- als auch Auswärtsrektifizierer sein können. Als erster K^+ -Kanal wurde der *Shaker*-Kanal aus *Drosophila melanogaster* identifiziert. Die Namensgebung beruht auf dem heftigen Zittern von mit Ether narkotisierten Mutanten. Insgesamt gehören zu dieser Familie der K_v -Kanäle 8 Subfamilien (Übersicht in Coetzee *et al.*, 1999). Durch Homologievergleich können verschiedene konservierte Domänen identifiziert werden (Jan

und Jan, 1997): 6 Transmembrandomänen; als S1 bis S6 bezeichnet, wobei N- und C-Terminus cytoplasmatisch lokalisiert sind; die Porendomäne (P) mit der Signatursequenz TXGYG, die den Selektivitätsfilter der ionenleitenden Pore bildet; die als Spannungssensor bezeichnete S4-Domäne, welche die Aktivierung und Inaktivierung in Abhängigkeit vom Membranpotential vermittelt; die N-terminal gelegene T1-Domäne, die für die Oligomerisierung der Kanaluntereinheiten wichtig ist. K_v -Kanäle können *in vivo* Heterotetramere mit unterschiedlichen Subfamilienmitgliedern bilden, was eine große Diversität der K^+ -Kanalaktivitäten zur Folge hat. Ein wesentlicher Unterschied zwischen tierischen und pflanzlichen 6TM1P-Kanälen ist die Deaktivierung tierischer K_v -Kanäle, vermittelt durch eine globuläre Struktur des N-Terminus, welcher die Pore verschließen kann. Diese Funktion kann auch von einigen $K_v\beta$ -Untereinheiten übernommen werden.

Die K^+ -Kanal- α -Untereinheiten der 2TM1P-Familie vermitteln in tierischen Zellen einen K^+ -Einstrom (Übersicht in Reimann und Ashcroft, 1999). In Pflanzen ist nur 1 Mitglied bekannt: KCO 3, dessen Funktion noch nicht charakterisiert wurde (Czempinski *et al.*, 1999). Die 4TM2P-Kanäle zeigen in tierischen Zellen keine oder kaum Rektifizierungseigenschaften (Übersicht in Goldstein *et al.*, 2001), während sie in pflanzlichen Zellen K^+ -Auswärtsrektifizierung vermitteln. Als Vertreter der 8TM2P-Kanäle ist allein TOK1, ein Auswärtsrektifizierer aus *S. cerevisiae*, bekannt.

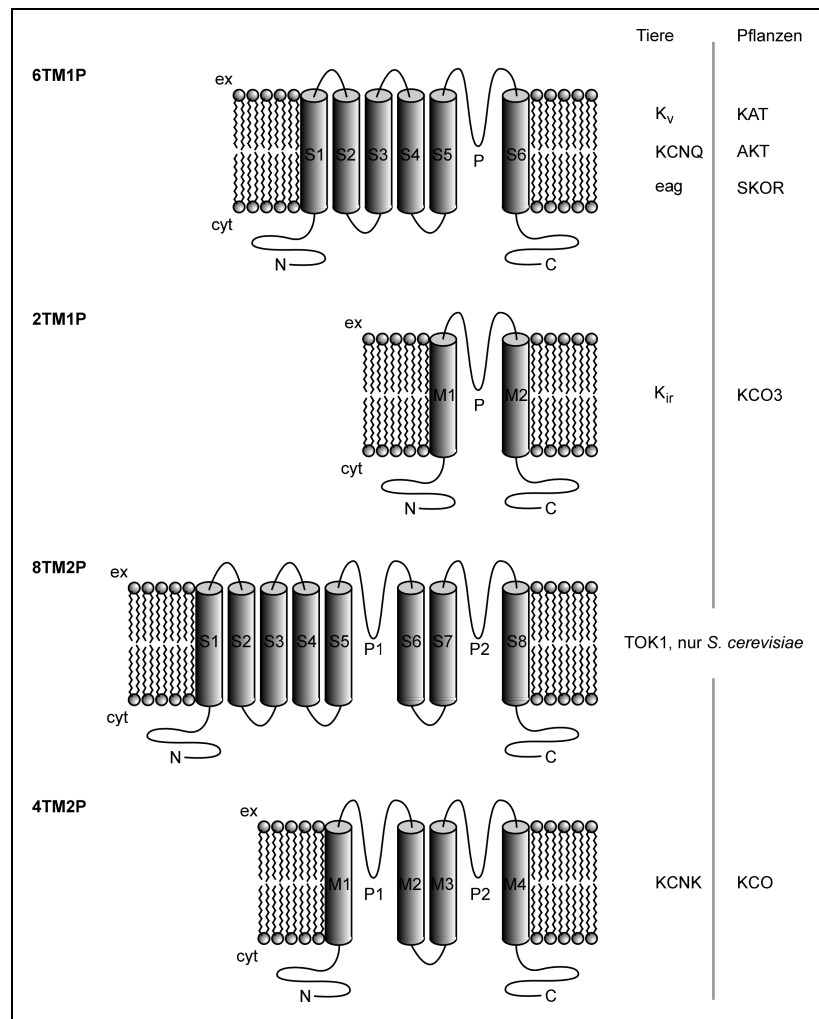


Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der Membrantopologie der unterschiedlichen K^+ -Kanal- α -Untereinheiten. Die bisher bekannten K^+ -Kanäle haben entweder 6 (6TM1P), 2 (2TM1P), 8 (8TM1P) oder 4 (4TM1P) Transmembrandomänen. Die Porenregionen sind als Schleifen dargestellt. Rechts sind Beispiele von Kaliumkanalfamilien in Tieren und Pflanzen angegeben. Kanäle mit 8 Transmembranhelices wurden bisher nur in Hefe nachgewiesen.

Struktur der Kaliumkanal- α -Untereinheit KcsA. KcsA ist der erste Kaliumkanal, dessen Struktur röntgenkristallografisch aufgeklärt wurde und wegen der hohen Ähnlichkeit zu anderen Kaliumkanälen als allgemeines Modell der K^+ -Leitfähigkeit herangezogen werden kann. KcsA ist ein über den pH-Wert regulierter 2TM1P- K^+ -Kanal aus *Streptomyces lividans*. Durch Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, daß KcsA als Tetramer kristallisiert (Doyle *et al.*, 1998). Die daraus abgeleitete Struktur wird als *inverted teepee*-Modell bezeichnet (Abb. 1.3 A): Die vier Transmembran-Helices (M1) bilden den äußeren Rand des funktionellen Kanals. Die Pore wird aus den Poren-Helices und -Schleifen gebildet, welche nahe der extrazellulären Seite der Membran liegen. Die C-terminalen Helices (M2) bilden das

Kanalinnere aus. Der Selektivitätsfilter wird vor allem durch die Carbonylsauerstoffatome gebildet (Abb. 1.3 B), woran sich eine wassergefüllte Höhle anschließt. Insgesamt umspannt der KcsA-Kanal eine Länge von etwa 34 Å.

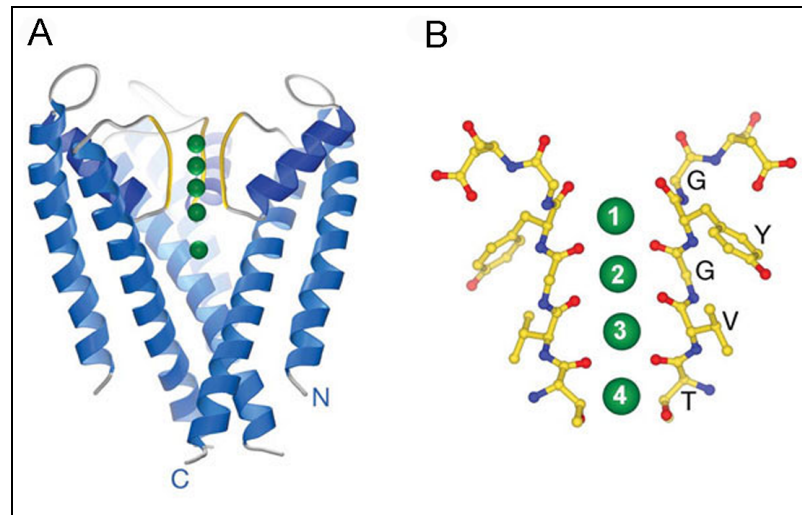


Abbildung 1.3. Schematische Darstellung der Kristallstruktur des KcsA-Proteins [nach Morais-Cabral *et al.*, 2001]. (A) KcsA dargestellt als *ribbon band*-Modell, wobei die vorderste α -Untereinheit der Übersicht halber weggelassen ist. Die Porenhelix (dunkelblau, rechte Untereinheit zuvorderst) und die Porenschleife (gelb) weisen vom Extrazellularraum in das Kanalinnere. Die kristallisierten K^+ -Ionen sind grün dargestellt, wobei 4 K^+ -Ionen in der Pore und eines in der wassergefüllten Höhle gezeigt ist. (B) Darstellung des sogenannten Selektivitätsfilters, der aus den Aminosäuren der Signatursequenz TXGYG gebildet wird. Die durch den Carbonyl-Sauerstoff gebildeten K^+ -Bindestellen (1,3 - innere Konfiguration; 2,4 - äußere Konfiguration) sind nummeriert. Der Farbcode ist: Kohlenstoff - gelb; Stickstoff - blau; Sauerstoff - rot.

Durch verbesserte Auflösung der Röntgenstruktur konnte ein Modell für die K^+ -Ionenleitung erstellt werden (Morais-Cabral *et al.*, 2001; Bernèche und Roux, 2001): In der funktionelle Pore stehen vier K^+ -Bindestellen zur Verfügung, die durch zwei K^+ -Ionen, getrennt durch ein Wassermolekül, besetzt sind (*multi-ion pore*). Dieses K^+ -Paar bewegt sich konzertiert zwischen den Positionen 1,3 (äußere Konfiguration) und 2,4 (innere Konfiguration) (s. Abb. 1.3 B). Gelangt ein Kaliumion in die wassergefüllte Höhle, wird durch Umspringen der Konfiguration ein K^+ in den Extrazellularraum abgegeben.

1.2 Die pflanzlichen 6TM1P-K⁺-Kanal- α -Untereinheiten

1.2.1 Struktur der K⁺-Kanal- α -Untereinheiten

Allen *Shaker*-ähnlichen, pflanzlichen K⁺-Kanal- α -Untereinheiten ist ein vergleichbarer Aufbau gemeinsam. Die Kanal-Untereinheit wird gebildet aus 6 Transmembrandomänen, einer Pore, die sich aus Porenhelix und Porenschleife zusammensetzt, der zyklisch-Nukleotid bindenden Domäne (cNBD), den Ankyrin-Domänen und der K_{HA}/K_T-Domäne (Abb. 1.4); die einzelnen Domänen sollen im folgenden kurz erläutert werden.

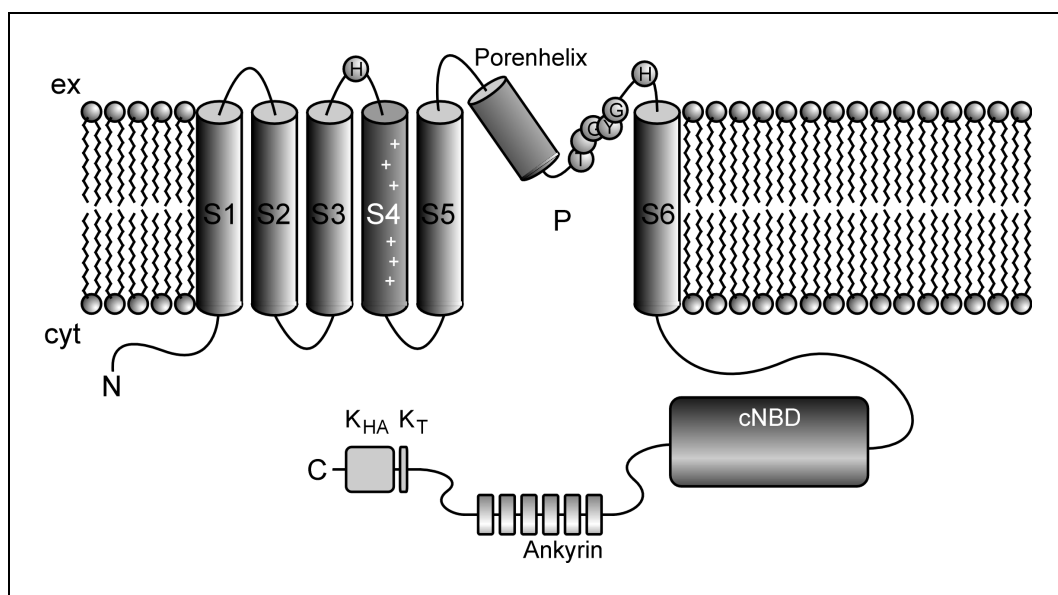


Abbildung 1.4. Schematische Darstellung des Aufbaus der pflanzlichen 6TM1P-Kanal- α -Untereinheiten. Die Pore (P) wird aus der Porenhelix und der Porenschleife gebildet; die Aminosäuren des Selektivitätsfilters (TXGYG) sind durch Kreise dargestellt. Zusätzlich sind zwei Histidin-Reste (H) hervorgehoben, die in den Extrazellulärraum gerichtet sind und an der pH-Regulation des Kaliumkanals beteiligt sind. Nähere Erläuterungen dazu im Text.

(1) 6 Transmembrandomänen S1 bis S6 und Spannungssensor S4. Die S4-Domäne mit mehreren hydrophilen und positiv geladenen Aminosäuren wird als Spannungssensor diskutiert, welcher das potentialgesteuerte Schaltverhalten des Kanals vermittelt. Chimären zwischen dem pflanzlichen Einwärtsgleichrichter KAT1 und einem tierischen Auswärtsgleichrichter (Xsha2) zeigten in elektrophysiologischen Untersuchungen, daß der N-terminale Bereich bis einschließlich S4 hinreichend für die Rektifizierungseigenschaften ist (Cao *et al.*, 1995a). Der Austausch einer positiv geladenen Aminosäure im S4-Segment des KAT1 (R176S: Marten und Hoshi, 1998 und R176I, bzw. R177Q: Zei und Aldrich, 1998.

Die Schalteigenschaften eines K^+ -Kanals können aber auch durch die $[K^+]$ reguliert werden, wie z. B. nachgewiesen für AKT1 (Bertl *et al.*, 1997).

(2) **Die Porendomäne (P).** Die Porendomäne, der Aminosäurebereich zwischen den Transmembransegmenten S5 und S6, bildet mit der sogenannten Signatursequenz TXGYG die Kalium-selektive, ionenleitende Kanalpore.

Durch Expressionsanalyse des KAT1 in *E. coli* wurde gezeigt, daß der Porenrand zum Extrazellularraum hin geöffnet ist (Uozumi *et al.*, 1998). Durch verschiedene Mutationen in der Porenregion konnten einzelnen Aminosäuren Funktionen in der pH-vermittelten Regulation des Kanals KAT1, seiner Ionenselektivität und der Inhibierung durch verschiedene Kanalblocker wie Cs^+ , TEA^+ , Ba^{2+} oder auch Ca^{2+} zugeschrieben werden (Übersicht in Schachtman, 2000).

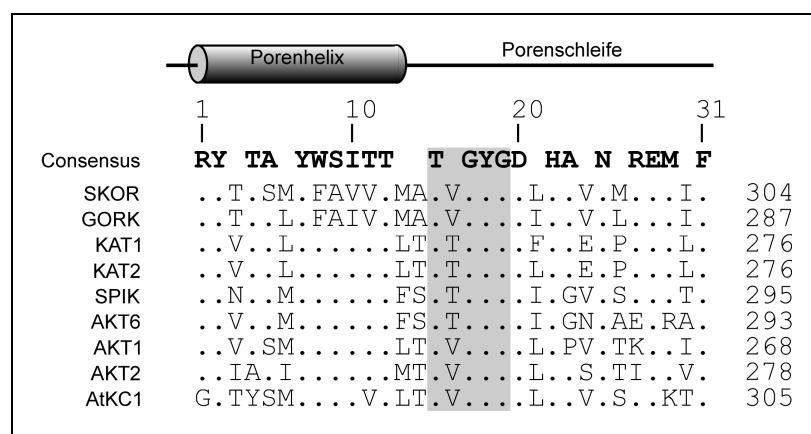


Abbildung 1.6. Darstellung der Porendomäne in Analogie zu KcsA. Oben in der Grafik ist der Abschnitt der α -Helix und der Porenschleife skizziert. Darunter befindet sich der Vergleich der Aminosäuresequenz der bekannten 6TM1P-Kanäle aus *A. thaliana*. Als Konsensussequenz wird eine Übereinstimmung von mindestens 6 identischen Aminosäuren angenommen. Punkte (.) bezeichnen Übereinstimmung mit der Konsensussequenz. Die Zahlen über der Konsensussequenz geben die auf diesen Ausschnitt bezogene, willkürliche Aminosäure-Position in der Porendomäne an. Die Aminosäuren des Selektivitätsfilters sind grau unterlegt.

KST1 wird, wie auch KAT1, positiv durch Protonen reguliert, d. h. der Kanal öffnet nach extrazellulärer Acidifizierung schon bei positiveren Membranpotentialen. Aminosäuren, welche diese pH-Regulation vermitteln, wurden wiederum durch Mutagenisierungsstudien identifiziert: Wird das in allen pflanzlichen *Shaker*-ähnlichen Kanälen hochkonservierte His₂₇₁ (KST1, Aminosäureposition 22 der Konsensussequenz, Abb. 1.6) zu Ala mutiert, wird der pH-Effekt abgeschwächt (Hoth *et al.*, 1997). In der Kanaluntereinheit KAT1 bewirkt

diese Mutation (H267A) jedoch kaum elektrophysiologische Änderungen, wohingegen der Aminosäureaustausch nahe der Signatursequenz GYGD (D265N, Position 20 der Konsensussequenz, Abb. 1.6) die pH-Regulation umkehrt, d. h. eine Protonen-Inaktivierung bewirkt (Hoth und Hedrich, 1999). Es sind aber auch andere Aminosäuren bei der pH-Regulierung involviert, z. B. His₁₆₀ in der extrazellulären Schleife zwischen S3- und S4-Segment (Abb. 1.4, Hoth *et al.*, 1997).

Ebenso wie die extrazelluläre pH-Regulation beeinflussen intrazelluläre Protonen das Aktivierungspotential und erhöhen die Aktivierungskinetik (Hoshi *et al.*, 1995); dies wird vermittelt durch His₁₁₈ in der cytoplasmatischen Schleife zwischen dem S2- und S3-Segment (Tang *et al.*, 2000).

(3) Die zyklisch-Nukleotid-bindende Domäne (cNBD). Im cytosolischen, carboxyterminalen Bereich befindet sich eine Region mit hoher Ähnlichkeit zur cAMP-bindenden Domäne des *catabolite gene activator protein* aus *Escherichia coli* und wird daher als zyklisch-Nukleotid-bindende Domäne (cNBD) diskutiert. Eine direkte Interaktion von Nukleotiden konnte zwar bisher nicht nachgewiesen werden, es konnten jedoch Hinweise zur Kanalregulation durch ATP und cGMP erbracht werden. ATP ist für die Aktivität der K⁺-Kanäle KAT1 (Hoshi *et al.*, 1995), KST1 (Müller-Röber *et al.*, 1995), AKT1 (Gaymard *et al.*, 1996) und SKT1 (Zimmermann *et al.*, 1998) erforderlich: Es bewirkt eine Verschiebung des Aktivierungspotentials zu positiveren Membranspannungen. Jedoch ist ungeklärt, ob ATP direkt an die Kanaluntereinheit bindet oder ob Phosphorylierungsereignisse die Aktivität beeinflussen.

cGMP hat einen zu ATP gegensätzlichen Effekt: Es verschiebt die Aktivierungsspannung hin zu negativeren Membranspannungen (Hoshi *et al.*, 1995; Gaymard *et al.*, 1996) Wiederum ist unklar, ob direkte Bindung dafür verantwortlich ist oder aber cGMP-aktivierte Proteinkinasen.

Die cNBD ist, wie Deletionsstudien zeigten, unerlässlich für die funktionelle Expression in *X. laevis* Oozyten (Marten und Hoshi, 1997) und vermittelt die Homooligomerisierung der Kanaluntereinheiten, wie am Beispiel von AKT1 in der Hefe-2-Hybrid-Analyse gezeigt wurde (Daram *et al.*, 1997).

(4) **Die K_{HA} -Domäne.** Im extremen carboxyterminalen Bereich ist eine Region von etwa 60 Aminosäuren lokalisiert, welche viele hydrophobe und negativ geladene Aminosäuren enthält (K_{HA} , s. Abb. 1.7). Ehrhardt *et al.* (1997) diskutierten eine Beteiligung dieser Domäne an der Tetramerisierung der Kanaluntereinheiten, sowie bei der lokalen Anhäufung der Kaliumkanäle in der Plasmamembran (*clustering*). Das *clustering* von KST1-Kanalmutanten, die um die K_{HA} -Domäne verkürzt wurden, ist in Sf9-Insektenzellen aufgehoben, obwohl diese weiterhin elektrophysiologisch funktionell bleiben (Ehrhardt *et al.*, 1997). Durch Hefe-2-Hybrid-Technik konnte gezeigt werden, daß die K_{HA} -Domäne vor allem mit dem Segment zwischen S6 und der cNBD interagiert, nicht jedoch mit sich selbst (Daram *et al.*, 1997).

K_T		K_{HA}	
Konsensus	RVTI	GK LP S EEL A K G AEIDD D IRDGD LY	
SKOR	HPGD (N) ₅	RR.IVLWV.R.I...IRT.KEQLNVPEASC--VLSEDE.K.I.V.L.S..QK..LAVET	828
GORK	HPQE (N) ₇	KH.VVWV.SNL.K.IVT.AKEL.LSDGASFVLLSEDQGR.T.I.M.S..HK..MISDTTDQT	820
KAT1 (N) ₆	KN..LIL..S.I...LRL.SE.F.GCNF-T-KITNADN.....L.V.W...H..F--SS--N	677
KAT2 (N) ₇	DLS.LII..A.I...LRL.GE.F.-YSF-T-KVTNAEN.....E.V.....H..ILINEN--S	697
SPIK (N) ₇	TG..VVL..N.M...LKIGEN.M.FVPT-K-VLTREG-.....ITL....F.--LLSRD--P	888
AKT6 (N) ₅	SS..VVK..D.L...IEIGEK.L.FVAT-K-ILSREG-.....IRI.....F.--LLLKV--S	880
AKT1 (N) ₇	IA..LVL..G.FK..LELGSN.F.IVAT-K-VMNKDNN.....V.V.....H.--IFATD--S	857
AKT2	..S. (N) ₁₄	EA..LIL..P.LDD.KKI.GE.F.FDGSET-MVTNEDG....SIEV...N.K..FVVNKI--I	787
AtKC1	..I. (N) ₁₅	SN.RLII..D.IQL.FDL.EK.L.--KRGS-TIAMADG.HVEQI.AL.EN.H..IF	662

Abbildung 1.7. Konsensussequenz und Aminosäurevergleich der K_{HA} - und der K_T -Domäne. Als Konsensussequenz wird eine Übereinstimmung von mindestens 6 identischen Aminosäuren angenommen, bei der K_T -Domäne 5 identische. Punkte (.) bezeichnen Übereinstimmung mit der Konsensussequenz. Minus-Zeichen (-) bezeichnen fehlende Aminosäuren, um eine höhere Übereinstimmung zwischen den Sequenzen zu erreichen. Die K_T -Domäne ist grau unterlegt. Der Bereich zwischen K_T - und K_{HA} -Region ist der Übersicht halber nur durch die Anzahl der Aminosäuren angegeben ((N)_x).

Durch elektrophysiologische Analyse von in der K_{HA} -Domäne deletierten Mutanten konnte der für die Assemblierung verantwortliche Bereich eingegrenzt werden auf die K_T -Domäne, die N-terminal der K_{HA} -Domäne lokalisiert ist (Abb. 1.7) und zusätzlich eine mögliche Phosphorylierungsstelle besitzt (Zimmermann *et al.*, 2001).

Möglicherweise vermittelt die K_{HA} -Domäne, ähnlich der N-terminal gelegenen T1-Domäne von K_v -Kanälen (s. a. 1.1), eine kinetisch begünstigte Assemblierung, ohne "unkorrekte" Tetramerisierung zu unterbinden (Zerangue *et al.*, 2000).

(5) **Die Ankyrin-Domäne.** Die Mitglieder der AKT- und SKOR-Gruppe zeichnen sich durch 4 bis 6 Ankyrindomänen N-terminal der cNBD aus. Diese etwa 33 Aminosäuren langen Wiederholungen können mit strukturell sehr unterschiedlichen Proteinen interagieren (Übersicht in Sedgwick und Smerdon, 1999). Das Ankyrin-Protein in Erythrozyten bindet als Adaptermolekül an Spektrin und vermittelt derart die Bindung vielfältiger Proteine an das Zytoskelett (Überblick bei Bennett und Chen, 2001). Jedoch besitzen KAT1 und KAT2 keinerlei derartige Domänen. KAT1 besitzt, anders als KAT2, statt der Ankyrin-Domäne im extremen C-Terminus einen Bereich hoher Dichte von basischen Aminosäuren, welcher Ähnlichkeit zum *Microtubule associated protein*, MAP1b, zeigt (Marten und Hoshi, 1997). Durch diese Domäne interagiert MAP1b mit den Mikrotubuli (Noble *et al.*, 1989). Darüber hinaus führte der Befund, daß Toxine wie Phalloidin und Cytochalasin D, welche das Zytoskelett beeinflussen, auch die K⁺-Kanalaktivität in Schließzellen verändern (Hwang *et al.*, 1997), zu der Annahme, daß die Ankyrin-Domäne möglicherweise die Bindung von Kanälen an das Zytoskelett vermittelt. Allerdings konnte Huang *et al.* (2000) zeigen, daß Cytochalasin D und Oryzalin die Stomabewegung unabhängig von Kaliumströmen beeinflussen.

Die Funktion der Ankyrin-Domäne bei der Wechselwirkung des Kaliumkanals mit dem Zytoskelett oder anderen Proteinen bleibt unklar.

1.2.2 K⁺-Kanal-Interaktionen

(1) **Tetramerisierung.** Zur Bildung des funktionellen Kanals bilden die Kaliumkanal- α -Untereinheiten einen tetrameren Komplex aus. Homotetramere, Komplexe aus vier identischen Untereinheiten, konnten durch Gelfiltrations-Chromatographie für die rekombinanten Kaliumkanal- α -Untereinheiten AKT1 (Daram *et al.*, 1997; Urbach *et al.*, 2000) und KAT1 (Urbach *et al.*, 2000) gezeigt werden. Für AKT1 konnte mittels dieser Methodik gezeigt werden, daß der C-Terminus hinreichend ist, um diese Tetramerisierung zu vermitteln (Daram *et al.*, 1997).

Die Heterooligomerisierung von K⁺-Kanal- α -Untereinheiten wurde vor allem durch zwei Techniken nachgewiesen: Einerseits durch Hefe-2-Hybrid-Analyse, mittels derer Interaktion von AKT1 (Daram *et al.*, 1997) und KST1, SKT1, SKT2 und SKT3 (Ehrhardt *et al.*, 1997) gezeigt wurde. Andererseits durch Änderung der elektrophysiologischen Kanaleigenschaften in Co-Expressionsstudien in heterologen Systemen und in transgenen A.

thaliana-Pflanzen, welche K^+ -Kanalmutanten mit veränderter elektrophysiologischer Charakteristik exprimieren. In *X. laevis* Oozyten wurden die Interaktionen von SKT1, AKT1, und AtKC1 mit KAT1, und KST1 (Dreyer *et al.*, 1997) und KAT1 und AKT2 (Baizabal-Aguirre *et al.*, 1999) nachgewiesen. Durch Expression Cs^+ -resistenter (Ichida *et al.*, 1997) oder dominant negativer (Kwak *et al.*, 2001) KAT1-Mutanten konnte in Schließzellen ein verändertes Verhalten der Stomabewegung gezeigt werden, was auf eine Interaktion mit einem oder mehreren endogenen Kanalproteinen hinweist. Andererseits wurde durch Gelfiltrations-Chromatographie gezeigt, daß die rekombinanten K^+ -Kanal- α -Untereinheiten KAT1 und AKT1 Homotetramere, nicht jedoch Heterotetramere bilden (Urbach *et al.*, 2000).

(2) Kaliumkanal- β -Untereinheiten. In *A. thaliana* konnte bisher nur ein den tierischen $K_v\beta$ -Untereinheiten homologes Gen identifiziert werden: KAB1 (Tang *et al.*, 1995; Spoormaker, 1998). KAB1 zeigt *in planta* Kolo-kalisierung zu KAT1 und AKT1 (Tang *et al.*, 1998); Koexpression von KAB1 zusammen mit KAT1 in *X. laevis* Oozyten zeigte weitgehend unveränderte elektrophysiologische Eigenschaften, jedoch erhöht sich die Kanaldichte an der Plasmamembran, so daß für KAB1 eine Stabilisierung des Kanalkomplexes diskutiert wird (Zhang *et al.*, 1999) und damit Ähnlichkeit zur Funktion der tierischen $K_v\beta 2$ - und -4-Untereinheit besitzt.

Pflanzenlinien mit verringertem KAB1-Gehalt (*antisense*-Suppression) zeigten kleinere Blätter und einen höheren Anthocyangehalt, während überexprimierende Pflanzen unter Langtagbedingungen größere Blätter und einen größeren Sproßdurchmesser aufwiesen (Spoormaker, 1998).

(3) Regulation durch G-Proteine. Hinweise auf eine Regulierung von K^+ -Strömen durch trimere G-Proteine (Übersicht in Millner, 2001) wurden vor allem durch GTP-Analoga wie GTP γ S (Aktivator) und GDP β S (Inhibitor von G-Proteinen) erbracht. GTP γ S führt zu einer Inhibierung von K^+_{in} -Strömen in Schließzellen (Fairley-Grenot und Assmann, 1991), wohingegen in Mesophyllzellen K^+_{out} -Ströme unterdrückt werden (Li und Assmann, 1993). Direkte Hinweise auf eine Beteiligung von G-Proteinen wurde vor allem durch zwei Experimente erbracht: Durch *antisense*- und *sense*-Co-Suppression einer $G\alpha$ -Untereinheit aus Tabak, NtGP α 1, wurde eine Aktivierung von K^+_{in} -Strömen in Mesophyllzellen nachgewiesen (Saalbach *et al.*, 1999). Durch T-DNA Mutagenese wurde in *A. thaliana* die prototypische

G α -Untereinheit GPA1 ausgeschaltet (Ullah *et al.*, 2001); in diesen Pflanzenlinien wurde ein Verlust der ABA-induzierten Inhibierung von K⁺_{in}-Strömen und des ABA-induzierten Stomaschlusses nachgewiesen (Wang *et al.*, 2001). Allerdings bleibt unklar, ob trimere G-Proteine oder die Untereinheiten direkt an K⁺-Kanäle binden, oder ob die Regulation über die Aktivierung von Phospholipasen (A₂, C und D) oder die Interaktion mit Ca²⁺-Kanälen (Aharon *et al.*, 1998) und eine daraus resultierende Änderung der [Ca²⁺]_{cyt} verläuft (Wu und Assmann, 1994).

(4) Regulation durch (De-)Phosphorylierungen. Im N-Terminus und vor allem im C-terminalen Bereich der K⁺-Kanalproteine finden sich viele mögliche Phosphorylierungsstellen, welche die Kanalregulation durch Kinasen und Phosphatasen nahelegen.

Li *et al.* (1998) konnten eine Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Aktivität von 57 kDa aus *V. faba* nachweisen, welche KAT1 direkt phosphoryliert. Desweiteren konnte auch ein Ca²⁺-unabhängiger, ABA-aktivierbarer Phosphorylierungsweg aufgezeigt werden: Eine Ser/Thr-Kinase aus *V. faba*-Schließzellen phosphoryliert ein C-terminales KAT1-Fragment (Mori *et al.*, 2000). Derartige Phosphorylierungen inhibieren KAT1, wie die Koexpression von rekombinanter CDPK aus Sojabohnen und KAT1 in *X. laevis* Oocyten zeigte (Berkowitz *et al.*, 2000). Daß diese Inhibierung möglicherweise durch Aufhebung der Interaktion der Kanal- α -Untereinheiten beruht, zeigte Ehrhard (1998) in Hefe-2-Hybrid-Analysen: Eine Mutation in der K_T-Domäne (T624D), welche eine Phosphorylierung an dieser Position nachahmt, unterbindet die KST1-Selbstinteraktion.

Phosphorylierungen sind reversibel und werden hydrolysiert durch Proteinphosphatasen. Durch pharmakologische Studien mit Okadasäure (OKA) und weiteren spezifischen Inhibitoren wurden Proteinphosphatasen des Typs PP1, PP2A und PP2B bei der K⁺-Kanalregulation diskutiert (Übersicht in MacRobbie, 1997). Proteinphosphatasen des Typs PP2C (ABI1 und ABI2) wurden durch Mutantenanalyse identifiziert: *abi1-1* und *abi2-1* Mutantenlinien, insensitiv gegenüber ABA-Behandlung, zeigen im Gegensatz zum Wildtyp keine ABA-induzierte Inhibierung von K⁺_{in}-Strömen in Schließzellen (Armstrong *et al.*, 1995). Eine direkte Interaktion zwischen einer K⁺-Kanal- α -Untereinheit und einer Proteinphosphatase konnte erstmals von Vrávňová *et al.* (2001) durch Hefe-2-Hybrid-

Durchmusterung nachgewiesen werden: AKT3 zeigt spezifische Interaktion mit AtPP2CA, nicht jedoch mit ABI1.

1.2.3 Die Mitglieder der pflanzlichen 6TM1P-Familie

Die Familie der pflanzlichen 6TM1P-K⁺-Kanäle können aufgrund der Ähnlichkeiten ihrer Aminosäuresequenzen in fünf Untergruppen eingeteilt werden (Abb. 1.8): KAT (KAT1 und KAT2), AKT (AKT1, SPIK, AKT6), SKOR (SKOR und GORK), AKT2 und AtKC1.

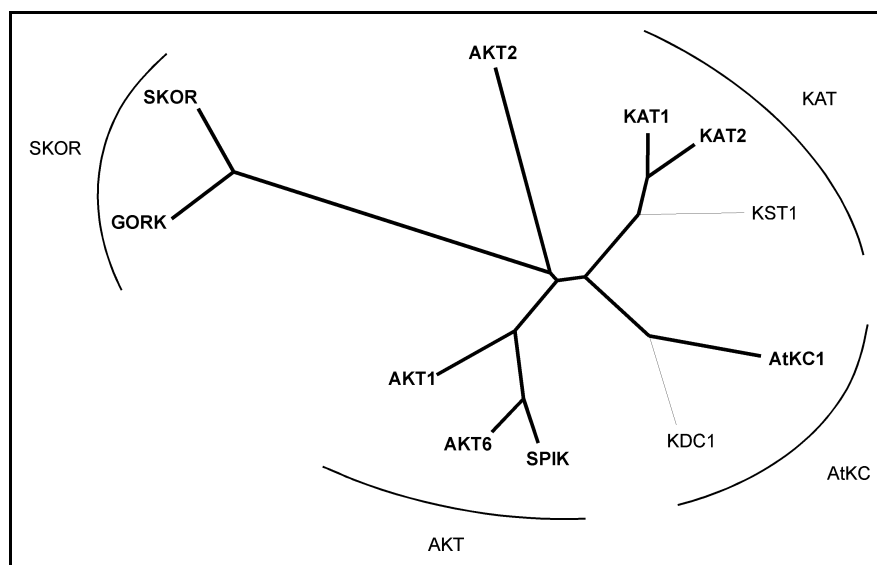


Abbildung 1.8. Ähnlichkeitsdendrogramm von pflanzlichen 6TM1P-K⁺-Kanälen. Die bekannten Kaliumkanäle aus *A. thaliana* sind fett dargestellt. Zusätzlich sind KDC1 aus *Daucus carota* und KST1 aus *Solanum tuberosum* eingefügt.

Der Kanaluntereinheit AKT1 wird eine Funktion bei der Kaliumaufnahme aus dem Boden zugeschrieben; durch Promotor-GUS-Analysen wurde AKT1 in ausgereiften Wurzeln in Epidermis, Cortex und Endodermis nachgewiesen (Lagarde *et al.*, 1996). *akt1-1* Mutantenlinien zeigten retardiertes Wachstum und herabgesetzte Keimfähigkeit, die unter Zusatz von NH₄⁺ noch gesteigert wurde (Spalding *et al.*, 1999).

Für den Transport von Kalium in den Apoplasten des Xylems konnte auf Proteinebene die Kaliumkanal- α -Untereinheit SKOR identifiziert werden (Gaymard *et al.*, 1998), die ausschließlich in Wurzel, speziell in Xylem Parenchymzellen nachgewiesen wurde. SKOR-Nullmutanten zeigten einen um die Hälfte verminderten K⁺-Gehalt im Pflanzensproß, während er in Wurzel unverändert blieb (Gaymard *et al.*, 1998).

Die Expressionsdaten von AKT2 im vaskulären Gewebe von Wurzeln und oberirdischen Pflanzenteilen deutet eine zweifache Funktion im K^+ -Transport an: Einerseits die Entladung des Xylemsaftes in die Mesophyllzellen von Blättern, andererseits die Beladung des Phloems in photosynthetisch aktiven Geweben (Deeken *et al.*, 2000; Lacombe *et al.*, 2000). Beide Aufgaben könnten durch das schwach rektifizierende Verhalten von AKT2 und der Regulation durch den pH-Wert erfüllt werden. Die Analyse von AKT2-Nullmutanten zeigte jedoch keine phänotypischen Änderungen, was möglicherweise auf eine Substitution der AKT2-Funktion durch AKT1 oder andere Kaliumkanäle zurückgeführt werden könnte (Dennison *et al.*, 2001).

Mit der Klonierung der SPIK- α -Untereinheit konnte erstmals der KaliumEinstrom in keimenden Pollen auf molekularer Ebene beschrieben werden (Mouline *et al.*, 2002): SPIK ist ausschließlich in Pollen exprimiert und vermittelt den K^+ -Einstrom während der Elongation des Pollenschlauches durch den Griffel zum Ovar hin. Pollen von SPIK-*knockout*-Pflanzen zeigen eine deutliche Reduktion in der Länge des Pollenschlauches, so daß die Konkurrenzfähigkeit um die Befruchtung durch diese Pollen herabgesetzt ist (Mouline *et al.*, 2002).

Mit der Klonierung von KAT1 aus *A. thaliana* (Anderson *et al.*, 1992) und KST1 aus *S. tuberosum* (Müller-Röber *et al.*, 1995) und ihrer Lokalisierung in Schließzellen (Nakamura *et al.*, 1995; Müller-Röber *et al.*, 1995) konnten die wahrscheinlichen Kaliumtransportsysteme in der Schließzelle identifiziert werden. Als möglicher Kaliumkanal, der den Ausstrom aus Schließzellen vermittelt, wurde GORK diskutiert (Ache *et al.*, 2000). Die Unterschiede zwischen der elektrophysiologischen Analyse an Schließzellen und an in *X. laevis* exprimierten K^+ -Kanälen legten den Schluß nahe, daß mit zusätzlichen Kaliumkanal- α -Untereinheiten Heterotetramere gebildet werden, oder aber zelltyp-spezifische, posttranslationale Modifikationen erfolgen (Brüggemann *et al.*, 1999).

Die detaillierten Expressionsdaten aller *Shaker*-ähnlichen K^+ -Kanäle aus *A. thaliana* sind in einer Übersicht im Anhang (6.2) zusammengestellt.

1.3 Zielsetzung

Durch die Sequenzierung des Genoms von *A. thaliana* konnten 9 *Shaker*-ähnliche K⁺-Kanal-Gene identifiziert werden (Mäser *et al.*, 2001). Einigen dieser 6TM1P-K⁺-Kanälen konnten Funktionen in der Kaliumaufnahme aus dem Boden und dem Transport innerhalb des Pflanzenkörpers zugeordnet werden. Um zu einem besseren Verständnis des Kaliumtransportes *in planta* zu kommen, sollten in dieser Arbeit Lokalisierung und Funktion der K⁺-Kanäle AtKC1 und KAT2 untersucht werden.

Die Lokalisierung von K⁺-Kanälen kann Hinweise auf ihre Funktion *in planta* und ihre mögliche Wechselwirkung mit anderen Proteinen und Kaliumkanälen geben. Darum sollte die zelluläre und subzelluläre Lokalisierung von AtKC1 in der Pflanze durch verschiedene Techniken gezeigt werden: *whole mount*-Immunfärbung, Expression von AtKC1::GFP-Fusionsproteinen in *A. thaliana* und Westernblot-Analysen.

Die funktionelle Expression von AtKC1 in *X. laevis* Oozyten gelang bisher nicht. Daher sollten die elektrophysiologischen Eigenschaften von AtKC1 in Sf9-Insektenzellen nach Infektion durch rekombinante Baculoviren untersucht werden.

Durch Nullmutanten-Analyse können Informationen zur Proteinfunktion *in planta* gewonnen werden. Deshalb sollten AtKC1-*knockout*-Linien isoliert und deren Phänotyp unter verschiedenen Wachstumsbedingungen beschrieben werden. Zusätzlich sollten diese Pflanzenlinien dazu genutzt werden, um die Funktion des Kaliumkanals *in planta* durch *patch clamp*-Analyse zu charakterisieren.

Da sich die gewebespezifische Expression während der Pflanzenentwicklung ändern kann, sollte die Expression von KAT2 durch Promotor-GUS-Studien näher untersucht werden. Entsprechende Pflanzenlinien standen bereits zur Verfügung.

Zu Beginn dieser Arbeit war nur ein unvollständiger cDNA-Klon von KAT2 veröffentlicht (Butt *et al.*, 1997). Daher sollte die vollständige cDNA isoliert werden, um den K⁺-Kanal in *X. laevis* Oozyten und Sf9-Zellen elektrophysiologisch zu charakterisieren.

Zur Untersuchung der Kanalfunktion *in planta* sollte aus einer *En-1*-Mutantenbibliothek eine KAT2-Insertions-Mutante isoliert werden.

Man mochte meinen, er könne nur mit den Händen denken, was mir eher eines Mechanikus würdig schien (und der Mechanikus, so hatte man mich gelehrt, ist *moechus*, er verhält sich ehebrecherisch gegenüber der *vita intellectualis*, anstatt im keuschesten Ehebunde mit ihr vereint zu sein).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Ackerschmalwand, Ökotyp Columbia

2.1.2 Insektenzellen

Spodoptera frugiperda, Sf9 (Invitrogen, Groningen)

2.1.3 Bakterien

Escherichia coli:

DH5 α : F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, *endA1*, *recA1*, *hsdR17*, (r_k^- - m_k^+), *deoR*, *thi-1*, *supE44*, λ^- , *gyrA96*, *relA1* (Hanahan, 1983)

DH10B: F⁻, *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, Δ (*ara, leu*)7697, *galU*, *galK*, λ^- , *rpsL*, *nupG* (Life Technologies, Karlsruhe)

DH10Bac: F⁻, *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, Δ (*ara, leu*)7697, *galU*, *galK*, λ^- , *rpsL*, *nupG* /bMON14272 / pMON7124 (Life Technologies, Karlsruhe)

JM109: F['], *traD36*, *lacI^q* Δ (*lacZ*), M15, *proA⁺B⁺*/e14⁻ (*McrA⁻*), Δ (*lac-proAB*), *thi-1*, *gyrA96* (Nal^R), *endA1*, *recA1*, *hsdR17*, (r_k^- - m_k^+), *supE44* (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

2.1.4 Vektoren

Bakterien:	pUC18:	Ap ^R (Vieira und Messing, 1982)
	pBlueskript KS (-):	Ap ^R (Stratagene, La Jolla)
	pGEMHE:	Ap ^R (Liman <i>et al.</i> , 1992)
Insekten:	pFastBac1:	Ap ^R , Kan ^R , Gent ^R , Tet ^R (<i>GibcoBRL</i> , Karlsruhe)
	pFastBacDual:	Ap ^R , Kan ^R , Gent ^R , Tet ^R (<i>GibcoBRL</i> , Karlsruhe)
	pFastBacHTa/b/c:	Ap ^R , Kan ^R , Gent ^R , Tet ^R (<i>GibcoBRL</i> , Karlsruhe)

2.1.5 Enzyme

Restriktionsenzyme	<i>Roche</i> , Mannheim
T4 DNA Ligase	<i>New England Biolabs</i> , Schwalbach/Taunus
Taq DNA Polymerase	<i>Roche</i> , Mannheim
SAP (Shrimps Alkaline Phosphatase)	<i>USB</i> , Cleveland
T4 DNA Polymerase	<i>New England Biolabs</i> , Schwalbach/Taunus
Lysozym	<i>Merck</i> , Darmstadt
Rediprime Labeling Kit	<i>Amersham Buchler</i> , Braunschweig
Ribonuclease A	<i>Sigma</i> , München

2.1.6 Chemikalien

[α - ³² P] dCTP	<i>Amersham Buchler</i> , Braunschweig
Aceton	<i>J. T. Baker Chemicals</i> , Deventer
Borsäure	
Ethanol	
β -Mercaptoethanol	
Tween-20	
Ampicillin	<i>Biomol</i> , Hamburg
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronsäure, CHA-Salz (X-Gluc)	
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	
Kanamycin	
Protein Assay Farbstoff Konzentrat	<i>Bio-Rad</i> , München
Anti-Kaninchen IgG-FITC Konjugate aus Ziege	
Dithiothreitol (DTT)	<i>Roche</i> , Mannheim
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	
Hygromycin	
Oligo-(dT)25 Magnetic Beads	<i>Dynal</i> , Hamburg
Calciumhypochlorit	<i>Fluka</i> , Neu-Ulm
Harnstoff	
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	
Agar	<i>Gibco BRL Lifetech</i> , Gaithersburg
Agarose	
RNA-Größenmarker	

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	
Gentamycin	
Fötales Kälberserum (FCS)	
Lipofectin	
Lambda DNA	<i>New England Biolabs, Schwalbach/Taunus</i>
SuperSignal™ Substrat	<i>Pierce, Rockfort</i>
Acrylamidlösung	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Phenol	
Bromphenolblau	<i>Serva, Heidelberg</i>
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	
Ponceau S	
Pyridoxin HCl	
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-propansulfonat (CHAPS)	<i>Sigma, München</i>
Coomassie Brilliant Blue	
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	
Lachssperma-DNA	
Leupeptin	
Murashige und Skoog Basal-salt-mixture	
Nikotinsäure	
Thiamin·HCl	
Insektenmedium TNM-FH	<i>Invitrogen, Groningen</i>

Alle weiteren Chemikalien waren reinst oder p.A.-Chemikalien der Firma *Merck*, Darmstadt.

2.1.7 Filter und Membranen

Hybond N	<i>Amersham Buchler, Braunschweig</i>
Miracloth	<i>Calbiochem, La Jolla</i>
Immobilon P (PVDF)	<i>Millipore, Molsheim</i>
Sterilfiltereinheiten (0,2 µm, 0,45 µm)	<i>Sartorius AG, Göttingen</i>
Sterilfiltereinheiten CN (150 ml/0,2 µm)	<i>Nalgene Company, Rochester</i>
3MM Papier	<i>Whatman, Maidstone</i>
Biodyne B	<i>Pall, Portsmouth</i>

2.1.8 Filmmaterial

Ektachrome T-64	<i>Kodak, Rochester</i>
Ektachrome X-400	
Röntgenfilme X-OMAT-AR-5	
Phosphor Screen GP, SO-230	
Super rapid intensifying screen	

2.1.9 Geräte

Spektralphotometer DU-40	<i>Beckman Instruments</i> , München
Szintillationszähler LS-7500	
TRIO-Thermoblock	<i>Biometra</i> , Göttingen
Elektroporator "Gene Pulser"	<i>Bio-Rad</i> , München
Sonifier 250	<i>Branson</i> , Danbury
Hybridisierungssofen HERAhybrid 6	<i>Heraeus</i> , Düsseldorf
Computer based gel imaging system	<i>Intas</i> , Göttingen
Microtom Leica RM2065	<i>Leitz</i> , Wetzlar
Mikroskop Leica DM RB	
Binokular Leica M420	
Phosphorimager STORM 860	<i>Molecular Dynamics</i> , Sunnyvale
GeneAmp TM PCR System 9600	<i>Perkin Elmer</i> , Weiterstadt
ABI Prism TM 377	
UV Stratalinker 1800	<i>Stratagene</i> , La Jolla
Zentrifugen: J2-21 und L7-65	<i>Beckman Instruments</i> , München
5417C	<i>Eppendorf</i> , Engeldorf
Megafuge 1.0	<i>Heraeus</i> , Düsseldorf
Biofuge 17RS und Varifuge 3.2RS	
Zellinkubatoren	<i>Heraeus</i> , Düsseldorf
Sterilbänke: LaminAir HA 2448 GS	<i>Heraeus</i> , Düsseldorf
antair BSK	<i>BioFlow Technik</i> , Meckenheim
PTC-225 Thermocycler	<i>MJ Research</i> , Watertown
EPC 9 patch clamp-Verstärker	<i>HEKA</i> , Lambrecht
Mikromanipulator Combi 25	<i>Luigs & Neumann GmbH</i> , Darmstadt-Eberstadt

2.1.10 Datenverarbeitung

Hardware:	Apple Power Macintosh 9600/233	
	PC IntelPentium	
Software:	Wisconsin Package	<i>Genetics Computer Group</i> , 1994
	DNASTAR	<i>Lasergene</i>
	STORM 860 Scanner Control 4.00 (build 50)	<i>Molecular Dynamics</i> , Sunnyvale
	Image Quant 1.1 (build 011)	
	Adobe Photoshop 4.0	<i>Adobe</i>
	ClarisDraw	<i>Claris Corporation</i>
	Endnote 4.0	<i>Niles & Associates</i>
	Microwoft Word	<i>Microsoft</i>
	Microsoft Excel	<i>Microsoft</i>
	SigmaPlot	
	DISKUS-Mikroskopische Dokumentation	<i>Technisches Büro C. H. Hilgers</i> , Königswinter
	Oligo 4.0-s	<i>National Bioscience, Inc.</i>
	Pulse 8.0	<i>HEKA</i> , Lambrecht

Datenbanken:	TIGR	http://www.tigr.org/tdb/ath1/htmls/index.html
	OVID	http://ovid.gwdg.de/
	The Arabidopsis Information Resource - tair	www.arabidopsis.org/
	MIPS Arabidopsis Group	mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html

2.1.11 Kulturmedien

2.1.11.1 Bakterienmedien

Die angegebenen Mengen wurden in 1 Liter bidest. H₂O gelöst; für Festmedien wurden 15 g Agar zugefügt; alle Medien wurden 20 min autoklaviert.

LB	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
		pH 7,5
YEB	5 g	Rinderextrakt
	1 g	Hefeextrakt
	5 g	Pepton
	5 g	Saccharose
	2 ml	1 M MgSO ₄ ·H ₂ O
		pH 7,5
2×YT	16 g	Trypton
	10 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
		pH 7,5

2.1.11.2 Insektenzellkulturmedien

Fötale Kälberserum wurde vor Verwendung 30 min auf 56°C erhitzt und in 50 ml-Aliquots bei -20°C gelagert.

500 ml TNM-FH wurde nach den Angaben des Herstellers angesetzt, mit 50 ml fötalem Kälberserum und 500 µl Gentamycin-Lösung (10 mg/ml) supplementiert und anschließend sterilfiltriert.

2.1.11.3 Pflanzenmedien

Die angegebenen Mengen wurden in 1 Liter *bidest.* H₂O gelöst.

ARA Festmedium:	2,15 g	Murashige und Skoog Basal-salt-mixture
	0,1 g	Myo-Inositol
	0,5 g	MES
	10 g	Saccharose
	8 g	Agar-Agar
	pH 5,7 mit KOH; 20 min autoklavieren; Zugabe von B ₅ -Vitaminen	
	Das Medium enthält 10 mM K ⁺	
ARA Flüssigmedium:	4,3 g	Murashige und Skoog Basal-salt-mixture
	0,1 g	Myo-Inositol
	0,5 g	MES
	30 g	Saccharose
	pH 5,7 mit KOH; 20 min autoklavieren; Zugabe von B ₅ -Vitaminen	
	Das Medium enthält 10 mM K ⁺	
100×B ₅ -Vitamine	100 mg	Nikotinsäure
	100 mg	Pyridoxin·HCl
	1 g	Thiamin·HCl
	10 g	Myo-Inositol
	100 mg	Glycin
	Sterilfiltrieren und bei –20°C lagern	

2.1.12 Antibiotika, Stammlösungen

	Stammlösungslösung		Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	in H ₂ O	100 µg/ml
Gentamycin	10 mg/ml	in H ₂ O	10 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	in H ₂ O	50 µg/ml
Rifampicin	100 mg/ml	in DMSO	100 µg/ml
Tetracyclin	7,5 mg/ml	in EtOH	50 µg/ml
IPTG	100 mM	in H ₂ O	0,5 mM
X-Gal	2 % (w/v)	in DMF	0,01 % (w/v)
X-Gluc	10 % (w/v)	in DMF	0,1 % (w/v)

Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und bei –20°C gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA Präparationen

Wenn nicht anders erwähnt, wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen gearbeitet. Zentrifugationen erfolgten in einer Tischzentrifuge (5417C, *Eppendorf*, Engeldorf) bei einer Maximalbeschleunigung von 20.000×g und Raumtemperatur.

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Minipräparation von Plasmid-DNA erfolgte in einer modifizierten Form nach Holmes und Quigley (1981). 1,5 ml einer Bakterienübernachtskultur (LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika; Sambrook *et al.*, 1989) wurden bei Maximalbeschleunigung 1 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl STEL Puffer resuspendiert, 45 s bei 95°C erhitzt, 15 min zentrifugiert und das weiße Präzipitat mit einem Zahnstocher entfernt. Nach Zugabe von 200 µl Isopropanol und kurzem Mischen erfolgte eine weitere Zentrifugation für 5 min. Nach Entfernen des Überstandes, Waschen mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol und kurzem Trocknen, wurde die DNA in 40 µl H₂O gelöst.

STEL: 8% (w/v) Saccharose; 5% (v/v) Triton X-100; 50 mM Tris; 50 mM EDTA; pH 8,0
Vor Gebrauch Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym

Für die Sequenzierung mit dem ABI Prism™ (*Perkin Elmer*, Weiterstadt, siehe auch 2.2.5.6) wurden die Plasmide mittels Qiagen Tip-20 Säulen nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) gereinigt. Größere Plasmidpräparationen aus 50 ml Bakterienübernachtskulturen (Sambrook *et al.*, 1989) wurden entsprechend mit Quiagen Tip-100 Säulen durchgeführt.

2.2.1.2 Isolierung von Bacmid-DNA aus *E. coli* DH10Bac

3 ml einer DH10Bac-Übernachtskultur wurden durch einminütige Zentrifugation pelletiert und in 300 µl Lösung 1 resuspendiert. Die Mischung wurde mit 300 µl Lösung 2 versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl 3 M KAc und 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden die gefällten Proteine durch Zentrifugieren für 10 min bei RT abgetrennt. Der Überstand wurde mit 800 µl Isopropanol versetzt, 5 min auf Eis inkubiert und die DNA durch Zentrifugation für 15 min bei RT präzipitiert. Das Pellet wurde zweimal mit je 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei RT), 5 min bei RT getrocknet und in 40 µl H₂O aufgenommen.

Lösung 1: 15 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0
Vor Gebrauch Zugabe von 100 µg/ml RNase A
Lösung 2: 0,2 M NaOH; 1,0 % (w/v) SDS

2.2.1.3 Isolierung von genomischer Pflanzen-DNA für Southernblot-Analysen

Etwa 1 g Pflanzenmaterial von 3 Wochen alten *A. thaliana* Wurzelkulturen oder Gewächshauspflanzen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend gemörsert und in 50 ml Falcon-Gefäße überführt. 15 ml 2×CTAB Puffer, vorgewärmt auf 65°C, wurden zugegeben und die Mischung für 20 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 15 ml Chloroform wurde vorsichtig durchmischt und bei Raumtemperatur für 10 min bei 4600×g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Falcon-Gefäß überführt, mit 45 ml Ethanol versetzt und für 30 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 4600×g und 4°C pelletiert. Der Niederschlag wurde kurz an der Luft getrocknet und anschließend in 1 ml H₂O aufgenommen. Die Lösung wird mit 30 µg RNase versetzt, für 40 min bei 37°C inkubiert und anschließend gegen 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 20800×g getrennt. Die obere Phase wurde mit 100 µl 10 M NH₄Ac und 700 µl Isopropanol versetzt und 30 min bei 20800×g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und anschließend in 400 µl H₂O aufgenommen.

2×CTAB: 2% (w/v) CTAB; 100 mM Tris; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 1 % (w/v) PVP; pH 8,0

2.2.1.4 Isolierung von genomischer Pflanzen-DNA für PCR

Ein etwa 1 cm langes *A. thaliana* Blatt wurde in einem Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in 400 µl Extraktionspuffer mit Hilfe eines Glasstabes homogenisiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde die genomische DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 300 µl Isopropanol gefällt, 5 min abzentrifugiert, getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst.

Extraktionspuffer: 0,2 M Tris; 0,25 M NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% (w/v) SDS; pH 7,5

2.2.2 RNA Präparation

Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurden alle benötigten Lösungen und Geräte entweder 2 mal 30 min autoklaviert, 8 h bei 180°C erhitzt, 1 h in 1 M NaOH inkubiert oder mit 0,1% (v/v) DEPC behandelt (Inkubation mit DEPC ü. N. bei RT, anschließend autoklaviert).

2.2.2.1 Isolierung von Poly (A)⁺ RNA

300 mg Blätter oder Wurzeln von 3 Wochen alten *A. thaliana* Wurzelkulturen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert, in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und in 1 ml Puffer A resuspendiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei RT und 20200×g für 5 min abzentrifugiert. Die Isolierung der Poly (A)⁺ RNA aus dem Überstand erfolgte mit Hilfe magnetischer oligo(dT)₂₅-Dynabeads: Der Überstand wurde zunächst mit 1,5 mg Beads (resuspendiert in 150 µl Puffer A) für 5 min bei RT inkubiert. Nach einer Minute im Magnethalter wurde der Überstand abgenommen und für eine zweite Extraktion auf Eis

gelagert. Nach dreimaligem Waschen der Beads mit je 500 µl Puffer B wurde die RNA anschließend mit 50 µl Puffer bei 65°C eluiert. Nach der zweiten Extraktion wurden die Eluate vereinigt und einer dritten Extraktion unterzogen. Die letzte Elution erfolgte in 30 µl Puffer C.

Puffer A: 100 mM Tris; 500 mM LiCl; 2 mM EDTA; 1% (w/v) SDS; 5 mM DTT; pH 8,0
Puffer B: 20 mM Tris; 150 mM LiCl; 1 mM EDTA; 0,2% (w/v) SDS; pH 7,5
Puffer C: 2 mM EDTA; pH 8,0

2.2.3 Protein Präparationen

2.2.3.1 Präparation mikrosomaler Proteine aus *A. thaliana*

Die mikrosomalen Protein-Fraktion wurden durch differenzielle Zentrifugation gewonnen: Etwa 5 g Pflanzenmaterial von 3 Wochen alten *A. thaliana* Wurzelkulturen oder Gewächshauspflanzen wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert und in einem 50 ml Falcon-Gefäß mit 10 ml HM Puffer für 15 min auf Eis aufgeschwemmt. Die Zelltrümmer und noch intakten Gewebeteile wurden 30 min bei 4.600×g und 4°C durch Zentrifugation abgetrennt. Aus dem Überstand wurden durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 27.000×g und 4°C die Zellkerne, Mitochondrien und Plastiden abgetrennt. Die verbliebenen Membranen und Vesikel wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 76.000×g und 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 100 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen.

HM Puffer: 250 mM Succrose; 100 mM Tris; 1 mM EDTA; 0,1 mM MgCl₂; 10 mM Ascorbinsäure; 19,85 mM Citronensäure; pH 8,0
Resuspendierungspuffer: 2,7 mM NaH₂PO₄; 47,4 mM Na₂HPO₄; 0,5 M NaCl; 3 M Harnstoff; pH 8,0

Beide Puffer wurden mit Proteaseinhibitoren versetzt: PMSF (Endkonzentration: 0,5 mM) und Trasylol (Endkonzentration: 4 µg/ml)

2.2.4 Methoden zur Konzentrationsbestimmung

2.2.4.1 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm bestimmt, wobei eine OD von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Über das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} kann die Reinheit der Präparation abgeschätzt werden.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

Aliquots der Proteinextrakte, bzw. entsprechender Puffer werden in einer Einmalküvette mit H₂O auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Bio-Rad-Färbelösung (1:5 mit H₂O verdünnt) gemischt. Nach einer Inkubation von 5 bis 30 min wurde dann die Absorption des Farbstoffkomplexes bei $\lambda = 595$ nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA erstellten Kalibriergerade ermittelt.

2.2.5 Enzymatische Reaktionen

2.2.5.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Definition: 1 U (Unit) Restriktionsenzym ist die Menge, die in 60 min 1 mg Lambda-DNA vollständig in einem Restriktionsvolumen von 50 µl bei 37°C spaltet.

Die Restriktionsspaltung von DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die eingesetzte Enzymmenge darf wegen ihres Glyceringehaltes 1/10 des Volumens des Reaktionsansatzes nicht überschreiten. In den DNA-Lösungen noch enthaltene RNA wurde durch Zugabe von RNase A zerstört.

Zur Kontrolle der DNA-Präparation nach der Hitze-Lyse-Methode (siehe 2.2.1.1) wurden 3 µl DNA mit 5 U Restriktionsenzym für 30 min gespalten und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.6.1).

Vektorschnitte erfolgten mit einem Überschuß an Enzym (4 U/mg DNA) für 2 bis 3 h. Zur Aufreinigung wurde der Ansatz einer Phenol/Chloroform Extraktion unterzogen und die DNA anschließend mit Ethanol gefällt (siehe unten).

Für die Isolierung eines zu klonierenden DNA-Fragmentes wurde wie folgt verfahren: Nach der Restriktion des entsprechenden Vektors wurde der Ansatz entweder gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Fragment aus dem Gel eluiert (siehe 2.2.6.1), oder der Ansatz wurde einer Chloroform/Phenol-Extraktion unterzogen und die DNA anschließend mit Ethanol gefällt.

Phenol/Chloroform Extraktion:

Der Restriktionsansatz wurde auf 200 µl mit H₂O verdünnt. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform (1:1 (v/v)) wurde gründlich gemischt und zur Phasentrennung 3 min bei maximaler Beschleunigung zentrifugiert. Zur Entfernung des Phenols wurde die obere Phase anschließend mit Chloroform nachextrahiert (200 µl Chloroform, vortexen, 3 min zentrifugieren und obere Phase abnehmen).

Ethanol Fällung:

Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 4,8 und 2,5 Volumen Ethanol erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei -70°C. Anschließend wurde die DNA 15 min bei maximaler Beschleunigung bei 4°C abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen (erneute Zentrifugation für 5 min), kurz bei 37°C getrocknet und in H₂O aufgenommen.

2.2.5.2 Dephosphorylierung von DNA

SAP entfernt selektiv Phosphatgruppen am 5'-Ende von DNA-Fragmenten. Bei Klonierungen kann somit die Religation linearisierter Vektoren verhindert werden. 0,2 U SAP/mg DNA wurden nach Beendigung der Restriktion direkt in den Ansatz gegeben und erneut für 1 h bei 37°C inkubiert. Es erfolgte entweder eine Chloroform/Phenol-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung (siehe 2.2.5.1) oder eine gelelektrophoretische Auftrennung mit anschließender Gelelution (siehe 2.2.6.1).

2.2.5.3 Auffüllreaktionen

T4-DNA-Polymerase füllt 5'-Überhänge auf, bzw. baut 3'-Überhänge ab. Für eine optimale Aktivität benötigt T4-DNA-Polymerase BSA. Nach Beendigung der Restriktion wurde der Ansatz deshalb unter Zugabe von T4-DNA-Polymerase, BSA, dNTPs (je 0,25 mM) und zusätzlichem Restriktionspuffer auf ein größeres Volumen aufgefüllt und erneut für 1 h bei 37°C inkubiert. Sollte anschließend eine zweite Restriktion erfolgen, so wurde die Polymerase durch 15 minütige Inkubation bei 75°C inaktiviert. Ansonsten erfolgte entweder eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung (siehe 2.2.5.1) oder eine gelelektrophoretische Auftrennung mit anschließender Gelelution (siehe 2.2.6.1).

2.2.5.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden mit T4-DNA-Ligase nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das zu klonierende Fragment lag im Falle kohäsiver Enden in 2- bis 5-fachem Überschuß, im Falle glatter Enden in mindestens 10-fachem Überschuß zum Vektor vor. Das Reaktionsvolumen betrug 5 ml, die Inkubationszeit bei kohäsiven Enden entweder 1 h bei 37°C oder 2 h bei RT, bei glatten Enden 4 h bei RT.

2.2.5.5 Radioaktive Markierung von DNA

Die zu markierende DNA wurde 5 min bei 95°C denaturiert und mit Hilfe des Rediprime Labeling Kits nach den Angaben des Herstellers mit [α -³²P]dCTP markiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mit dem PCR High Pure Kit nach den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim). Die Einbaurate der radioaktiven Nukleotide wurde mittels eines Szintillationszählers bestimmt. Die Sonde wurde 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend in Hybridisierungslösung verdünnt (2×10^6 cpm/ml).

2.2.5.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Methode von Sanger *et al.* (1977). Die Sequenzierungen wurden von der ADIS-Gruppe des MPI mit dem ABI Prism™ 377 nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR; Saiki *et al.*, 1988)

DNA Amplifikationen mittels PCR wurden entweder im GeneAmp™ PCR System 9600 (Perkin Elmer, Weiterstadt) oder im PTC-225 Thermocycler (MJ Research, Watertown) durchgeführt.

10×Taq-Puffer

200 mM Tris/HCl; 500 mM KCl; 12 mM MgCl₂; pH 8,4

PCR zur Identifikation der *En-1* Reinsertion

PCR-Ansatz	5 µl	genomische <i>A. thaliana</i> DNA (s. 2.2.1.4)
	5 µl	10×Taq-Puffer
	4 µl	dNTPs, je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	je 1 µl	20 µM Primer (At-1 und En-205) oder (At-1 und En-8130)
	0,5 µl	1 U/µl Taq DNA-Polymerase
	33,5 µl	H ₂ O
PCR-Bedingungen:	2 min	85°C
	40 s	94°C
	1 min	58°C
	2 min	72°C
	5 min	72°C
		40 ×
verwendete Primer	At-1	5'-GCC GTT GTT GTT GAG AAG AGG AAG G-3'
	En-205	5'-AGA AGC ACG ACG GCT GTA GAA TAG GA-3'
	En-8130	5'-GAG CGT CGG TCC CCA CAC TTC TAT A-3'

PCR zur Sequenzierung der Insertionsstelle der AtKC1-1294 Mutante

PCR-Ansatz	5 µl	genomische <i>A. thaliana</i> DNA (s. 2.2.1.4)
	5 µl	10×Taq-Puffer
	4 µl	dNTPs, je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	je 1 µl	20 µM Primer (At-1.1 und En-205) oder (At-4 und En-8130)
	1 µl	1 U/µl Taq DNA-Polymerase
	33 µl	H ₂ O
PCR-Bedingungen:	2 min	85°C
	40 s	94°C
	1 min	58°C
	2 min	72°C
	5 min	72°C
		40 ×
verwendete Primer	At-1.1	5'-TTG TTG TTG AGA AGA GGA AGG TCT T-3'
	En-205	s. o.
	En-8130	s. o.

PCR zur Identifizierung der Homo- oder Heterozygotie der Atkc1-f Mutanten

Dieser PCR-Ansatz wurde gleichermaßen dafür verwendet, die *footprint*-Stelle in der Atkc1-f Mutante zu identifizieren und zu sequenzieren.

PCR-Ansatz	5 µl	genomische <i>A. thaliana</i> DNA (s. 2.2.1.4)
	5 µl	10×Taq-Puffer
	4 µl	dNTPs, je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	je 1 µl	20 µM Primer At-1 und At-2
	1 µl	1 U/µl Taq DNA-Polymerase
	33 µl	H ₂ O
PCR-Bedingungen:	2 min	85°C
	40 s	94°C
	1 min	65°C
	2 min	72°C
	5 min	72°C
		40 ×
verwendete Primer	At-1	s. o.
	At-2	5'-CGC CGA ATA CCC AAC CAA TAT CAC C-3'

PCR zur Darstellung von Deletionsmutanten im 3'-Bereiches von *AtKCI*

PCR-Ansatz	5 µl	pBlueskript AtKCI (≈ 0,5 ng)
	5 µl	10×Taq-Puffer
	4 µl	dNTPs, je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	je 1 µl	20 µM Primer (At-5 und entweder At-Δ _C 26 oder At-Δ _C 33 oder At-Δ _C 80 oder At-Δ _C 128)
	0,5 µl	1 U/µl Taq DNA-Polymerase
	35 µl	H ₂ O

PCR-Bedingungen:	2 min	94°C	} 35 ×
	45 s	94°C	
	1 min	60°C	
	1:30 min	72°C	
	5 min	72°C	

verwendete Primer	At-5	5'-GGT TAC CGG ATA CAA TGA GGG AAC A-3'
	At-Δ _C 26	5'-CCC TCG AGT CAT CCT CGT TTC CCC AA-3'
	At-Δ _C 33	5'-CCC TCG AGC TAC TCA GCT AAG TCG AA-3'
	At-Δ _C 80	5'-CCC TCG AGT CAC TCT TCT ATC TGT CC-3'
	At-Δ _C 128	5'-CCC TCG AGT TAT AAC TCA TCA TTC AA-3'

PCR zur Amplifikation des 5'-Bereiches von *AtKCI* und *Actin-2* (RT-PCR)

PCR-Ansatz	5 µl	des Reverse Transkriptase behandelten Ansatzes
	5 µl	10×Taq-Puffer
	4 µl	dNTPs, je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	je 1 µl	20 µM Primer (At-1 und R-3306) oder (act2-RT1 und act2-RT2)
	1 µl	1 U/µl Taq DNA-Polymerase
	33 µl	H ₂ O

PCR-Bedingungen:	2 min	94°C	} 35 ×
	45 s	94°C	
	1 min	58°C (56°C für Actin-Primer)	
	1:30 min	72°C	
	5 min	72°C	

verwendete Primer	At-1	s. o.
	R-3306	5'-TTG AAT GTC TTC TCA CGG CTA TT-3'
	act2-RT1	5'-TTC CTC AAT CTC ATC TTC TTC C-3'
	act2-RT2	5'-GAC CTG CCT CAT CAT ACT CG-3'

PCR zur Deletion des Stop-Codons in der *AtKCI*-cDNA

PCR-Ansatz	1 µl	pBlueskript AtKCI (≈ 0,7 ng)
	5 µl	10×Taq-Puffer
	4 µl	dNTPs, je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	je 2 µl	40 µM Primer At-NdeI und At-EcoRI
	0,5 µl	3 U/µl Pfu DNA-Polymerase
	38,5 µl	H ₂ O

PCR-Bedingungen:	3 min	95°C	} 30 ×
	1 min	93°C	
	1 min	53°C	
	1:30 min	72°C	
	3 min	72°C	

verwendete Primer At-NdeI 5'-AGC ACA TAT GCA GCT CAA GTT CAA G-3'
 At-EcoRI 5'-GGG AAT TCG CCT GAG AAA ATA TAT-3'

PCR zur Isolierung des *KAT2*-Gens

PCR-Ansatz 5 µl genomische *A. thaliana* DNA
 5 µl 10×Taq-Puffer
 4 µl dNTPs, je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
 je 1 µl 20 µM Primer K2-Xho und K2-Bam
 1 µl 1 U/µl Taq DNA-Polymerase
 33 µl H₂O

PCR-Bedingungen: 2 min 85°C
 45 s 95°C }
 1 min 58°C } 35 ×
 1 min 72°C }
 5 min 72°C

verwendete Primer K2-Xho 5'-GGT GAA GAG AAA GCA CCT C-3'
 K2-Bam 5'-TTC TGA TGG ATT AAC ATT GTC CAG TT-3'

PCR zur Amplifikation der *KAT2*-cDNA (RT-PCR)

PCR-Ansatz 5 µl des Reverse Transkriptase behandelten Ansatzes
 5 µl 10×Taq-Puffer
 4 µl dNTPs, je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
 je 2,5 µl 25 µM Primer (K2 fw und K2 5' rev (bei einer Annealingtemperatur von 50°C); K2 3' fw und K2 rev (bei einer Annealingtemperatur von 51°C))
 0,5 µl 1 U/µl Taq DNA-Polymerase
 33,5 µl H₂O

PCR-Bedingungen: 5 min 95°C
 1 min 95°C }
 2 min 50/51°C } 40 ×
 4 min 72°C }
 10 min 72°C

verwendete Primer K2 fw 5'-CGC GGA TCC GTT GAA GAG AAA GCA CCT C-3'
 K2 3' fw 5'-GAG TTC TTA GTA TGC TCA GG-3'
 K2 rev 5'-TAT CTC GAG GGA TTA ACA TTG TCC AGT T-3'
 K2 5' rev 5'-CAT CGT GTC CAG AAA TAG TT-3'

2.2.5.8 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Für die cDNA-Synthese wurden 50 ng Poly (A⁺) RNA (s. 2.2.2.1) in einem Volumen von 0.5 µl eingesetzt. Die RNA wurde mit 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer und 30 µl DEPC-behandeltem Wasser versetzt, 5 min auf 70°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden nach Protokollangaben des Herstellers (GibcoBRL, Gaithersburg) 10 µl 5×FirstStrand Puffer, 5 µl DTT (0.1 M) und 2.5 µl dNTPs (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) zugegeben und für 2 min auf 42°C vorgewärmt. Die cDNA Synthese erfolgte mittels 1 µl Superskript Reverse Transkriptase (200 U) für 1 h bei 42°C. Anschließend wurde für 15 min auf 72°C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

5×FirstStrand Puffer 250 mM Tris/HCl; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; pH 8,3

2.2.6 Gelelektrophoretische Methoden

2.2.6.1 Auftrennung von DNA und Isolierung von Fragmenten

Die Gelelektrophorese erfolgte in horizontalen Agarose-Flachgelen. Den Gelen wurde 0,2 mg Ethidiumbromid/ml TBE zugesetzt, das den Fluoreszenznachweis getrennter DNA-Fragmente unter UV-Licht (254 nm) ermöglichte. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt. Als DNA-Größenstandart diente PstI geschnittene Lambda-DNA. Die Auftrennung der DNA-Fragmente fand in Abhängigkeit von der Größe in 0,8 bis 2,0 %igen Agarosegelen bei 5 V/cm Gelbreite statt.

TBE: 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; pH 8,0
 10×Probenpuffer: 15 % (w/v) Ficoll 400; 75 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; pH 8,0

Größenfraktionierung von DNA wurde auch zu präparativen Zwecken in Agarose-Flachgelen durchgeführt. Die Isolierung von Fragmenten erfolgte mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kit nach den Angaben der Hersteller (*Roche*, Mannheim).

2.2.6.2 Auftrennung von RNA

RNA wird unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 1 Volumen Probenpuffer versetzt, 10 min bei 60°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung erfolgte bei 2 V/cm Gelbreite. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen siehe 2.2.2.

RNA-Agarosegel:	1,2 g	Agarose
	72 ml	H ₂ O
	10 ml	10×MOPS pH 8,0
	<hr/>	
	Aufkochen, bis auf 50°C abkühlen lassen, dann Zugabe von 18 ml 37 %iger Formaldehydlösung	
10×MOPS:	200 mM MOPS; 80 mM NaAc; 10 mM EDTA; pH 8,0 für Gele, pH 7,0 für Laufpuffer	
2×Probenpuffer:	600 µl	Formamid
	80 µl	37 %ige Formaldehydlösung
	10 µl	10 % (w/v) Bromophenol
	100 µl	10×MOPS pH 7,0
	150 µl	H ₂ O

2.2.6.3 Auftrennung von Proteinen und Färbung

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel nach Laemmli (1970). Als Größenstandart wurde der Molecular Weight Marker von Bio-Rad verwendet. Die Lösungen für das Trenngel wurden zusammengegeben und die Polymerisation eingeleitet durch Zugabe von APS und TEMED. Die Lösung wurde zwischen zwei Glasscheiben (Abstand 1 mm) gegossen und mit H₂O überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Wasser entfernt, die Lösung für das Sammelgel überschichtet.

Die Proteinproben werden mit ¼ Volumen Probenpuffer versetzt; mikrosomale Präparationen wurden 30 min auf 42°C, die übrigen Proben 5 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese

erfolgte in einer Minigelapparatur (10 x 10 cm, MPI Werkstatt) mit einer Stromstärke von 15 mA (Passieren des Sammelgels), bzw. 25 mA (Durchlaufen des Trenngels).

Trenngel (10 %):	3 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 4,0 ml Acrylamidlösung (30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid); 600 µl 70 % (v/v) Glycerin; 4,2 ml H ₂ O; 120 µl 10 % (w/v) SDS; 40 µl 10 % (w/v) APS; 80 µl TEMED
Sammelgel (3 %):	2,5 ml 0,5 M Tris pH 6,8; 1,25 ml Acrylamidlösung (30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid); 6,15 ml H ₂ O; 100 µl 10 % (w/v) SDS; 30 µl 10 % (w/v) APS; 40 µl TEMED
5×Laufpuffer:	125 mM Tris; 1,0 M Glyzin; 0,5 % SDS; pH 8,3
5×Probenpuffer:	0,5 M Tris; 40 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 4 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; pH 7,0

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder auf PVDF-Membranen transferiert (siehe 2.2.7.4) oder im Gel gefärbt:

Coomassie-Färbung:

Die Färbung erfolgte für 2 bis 3 h bei RT mit Coomassie-Färbelösung. Der ungebundene Farbstoff wurde durch 3 bis 4 stündiges Waschen in Entfärbelösung entfernt, wobei die Lösung mehrfach erneuert wurde.

Coomassie-Färbelösung:	50 % (v/v) Ethanol; 7 % (v/v) Essigsäure; 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue
Entfärbelösung:	20 % (v/v) Methanol; 7 % (v/v) Essigsäure

Silberfärbung:

Zum Nachweis sehr geringer Proteinmengen im Gel wurde die Silberfärbung angewandt. Das Gel wurde 30 min in 10×Fixierungslösung, 15 min in 1×Fixierungslösung inkubiert und drei mal 5 min in H₂O rehydratisiert. Anschließend wurde in Thiosulfatlösung inkubiert, drei mal 30 s in H₂O gewaschen und 20 min in Silberlösung inkubiert. Das Gel wurde darauf zwei mal 20 s in H₂O gewaschen und über etwa 10 min in Entwicklungslösung geschwenkt. Die Reaktion wurde in 5 % (v/v) Essigsäure gestoppt.

Thiosulfatlösung:	0,2 g/l Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O
Silberlösung:	2 g/l AgNO ₃ ; 750 ml /l 37 %ige Formaldehydlösung
Entwicklungslösung:	60 g/l Na ₂ CO ₃ ; 500 ml/l 37 %ige Formaldehydlösung; 20 ml/l Thiosulfatlösung

2.2.7 Blotten von Nukleinsäuren und Proteinen

2.2.7.1 Southernblot

1 bis 2 µg genomische *A. thaliana* DNA (siehe 2.2.1.4) wurden mit 80 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 400 µl ü. N. bei 37°C geschnitten und anschließend präzipitiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 0,8 %igen Agarose-Flachgel bei 2 V/cm Gelbreite. Danach wurde das Gel in folgenden Lösungen inkubiert:

15 min Depurinierung:	250 mM Salzsäure
60 min Denaturierung:	1,8 M NaCl; 0,5 M NaOH
60 min Neutralisierung:	1,5 M NaCl; 0,5 M Tris; pH 7,5
10 min 20×SSC:	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat

Die Übertragung der DNA auf eine Hybond N oder Biotodyne B Membran erfolgte durch Kapillarkräfte über 4 h mit 20×SSC. Nach dem Transfer wurde die DNA über “UV-cross-linking” mit einer Energie von 480 mJ/cm² auf der Membran fixiert (Stratalinker UV Crosslinker 1800).

2.2.7.2 Blotten von PCR-Produkten

Die PCR-Ansätze von je 50 µl wurden gelelektrophoretisch in einem 1,0 %igen Agarose-Flachgel bei 4 V/cm Gelbreite aufgetrennt. Anschließend wurden Gel und Biotodyne Membran in 0,4 M NaOH für 30 min inkubiert und die PCR-Produkte durch Kapillarkräfte auf die Membran übertragen.

2.2.7.3 Northernblot

RNA liegt in Formaldehyd-Agarosegelen bereits denaturiert vor; die Behandlung des Gels wie bei einem Southern-Blot entfällt daher. Das Gel wurde lediglich 20 min in 20×SSC inkubiert. Transfer und Fixierung (240 mJ/cm²) erfolgten wie unter 2.2.7.1 beschrieben.

2.2.7.4 Westernblot

Nach Auftrennung im Polyacrylamid-Gel (siehe 2.2.6.3) wurden die Proteine mit Hilfe der Fastblot Apparatur (Typ B33, Biometra) auf Immobilon P-Membranen transferiert. Vor dem Blot wurde die PVDF-Membran aktiviert durch Inkubation für 5 s in Methanol und anschließend zwei mal 5 min in H₂O. Gel, Membran und 3MM-Papier wurden für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran wurde luftblasenfrei auf das Gel zwischen je 5 Lagen 3MM-Papier gelegt, so daß die Membran zur Kathode ausgerichtet wurde. Der Transfer erfolgte unter Wasserkühlung für 30 min bei 150 mV/cm².

Die Effizienz des Elektrotransfers wurde durch Anfärben der Proteine mit Ponceau-S-Lösung überprüft. Nach zweimaligem Waschen mit Entfärbelösung waren die Proteine als rote Banden sichtbar.

Transferpuffer:	25 mMTris; 192 mM Glyzin; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3
Ponceau-S-Lösung:	0,25 % (w/v) Ponceau-S; 40 % (v/v) Methanol; 15 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	40 % (v/v) Methanol; 15 % (v/v) Essigsäure

2.2.8 Nachweis filtergebundener Signale

2.2.8.1 Southernblot-Hybridisierung

Prähybridisierung, Hybridisierung und das Waschen der Membranen erfolgte in Glasröhren des Typs GL 45 (Amersham) im Hybridisierungs-Ofen HERAhybrid 6 (Heraeus).

Die Southern-Blot-Membranen wurden in Hybridisierungslösung (10 ml/160 cm²) bei 65°C für mindestens 2 h prähybridisiert. Anschließend wurde die Lösung gegen neuen Hybridisierungspuffer, der die radioaktiv markierte Sonde enthielt (siehe 2.2.5.5), ausgetauscht und für mindestens 6 h bei 65°C inkubiert. Unspezifisch gebundene DNA

wurde durch Waschen in abnehmender SSC-Konzentration (ansteigende Stringenz) entfernt. Die Detektion erfolgte in Filmkassetten mittels Phosphorscreens (Phosphor Screen GP, SO-230, Molecular Dynamics) für mindestens 2 Tage oder über die Belichtung von Röntgenfilmen (X-OMAT AR-5, Kodak) für mindestens 2 Tage.

Hybridisierungslösung: 5 mM EDTA; 0,9 M NaCl; 50 mM NaP_i; 1×Denhardts; 1 % (w/v) SDS; 250 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA; pH 7,0
100×Denhardts: 10 g Ficoll 400; 10 g PVP; 10 g BSA; gelöst in 500 ml H₂O sterilfiltriert und bei -20°C gelagert
Waschen: 2 mal 15 min in 2×SSC; 0,1 % (w/v) SDS; 60°C
10 min in 0,2×SSC; 0,1 % (w/v) SDS; 60°C

2.2.8.2 Northernblot-Hybridisierung

Mit den Northern-Blot-Membranen wurde wie unter 2.2.8.1 beschrieben verfahren, mit den folgenden Abweichungen: Die Hybridisierungslösung enthielt 50 % (v/v) Formamid, die Prähybridisierung und die Hybridisierung erfolgten bei 42°C, das Waschen wurde wie folgt durchgeführt: 2 mal 15 min mit 2×SSC; 0,1 % (w/v) SDS bei 42°C und 10 min mit 2×SSC; 0,1 % (w/v) SDS bei 55°C.

2.2.8.3 Immunfärbung filtergebundener Proteine

Nach dem Elektrottransfer wurde die Membran 10 min in TPBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockpuffer inkubiert. Die Bindung des Erstantikörpers erfolgte ü. N. bei 4°C in frischem Blockpuffer. Nichtgebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen für je 15 min in je 150 ml TPBS entfernt. Die Bindung des Zweitantikörpers (HRP-Konjugat) erfolgte in Blockpuffer für 2 h bei RT. Nichtgebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in je 150 ml TPBS entfernt. Die Membran wurde für 5 min in frisch angesetzter Reaktionslösung (SuperSignal™, Pierce) geschwenkt, zur Detektion des Fluoreszenzsignals auf einen Röntgenfilm gelegt und zwischen 5 s und 45 min belichtet.

Blockpuffer: 4 % (w/v) Magermilchpulver in TPBS
TPBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 0,02 % (v/v) Tween-20

2.2.9 Transformationsmethoden

2.2.9.1 Präparation elektrokompenter *E. coli* Zellen

Alle Zentrifugationschritte erfolgten bei einer Beschleunigung von 4400×g bei 4°C für 15 min.

5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur (LB-Medium) wurden in 500 ml LB-Medium verdünnt (2 l Erlenmeyerkolben) und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45 bei 37°C geschüttelt. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien viermal abzentrifugiert und wie folgt resuspendiert: 500 ml H₂O; 250 ml H₂O; 15,5 ml 10 % (v/v) Glycerin und 1 ml 10 % (v/v) Glycerin. Alle Flüssigkeiten wurden vorher auf 4°C gekühlt. Die Bakterien wurden in 40 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.9.2 Präparation kompetenter *E. coli* DH10Bac Zellen

3 ml einer Übernachtskultur in 2×YT Medium (supplementiert mit 50 mg/ml Kanamycin und 10 mg/ml Tetracyclin) werden in 300 ml 2×YT Medium (gleichermaßen supplementiert) verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45 geschüttelt. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien zweimal abzentrifugiert (10 min bei einer Beschleunigung von 1100×g bei 4°C) und wie folgt resuspendiert: 30 ml TFB I; 12 ml TFB II. Die Lösungen wurden vorher auf 4°C gekühlt. Die Bakterien wurden in 100 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

TFB I: 30 mM KAc; 50 mM MnCl₂; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glycerin
sterilfiltriert und bei 4°C gelagert

TFB II: 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glycerin; pH 7,0
sterilfiltriert und bei 4°C gelagert

2.2.9.3 Bakterientransformation (Elektroporation)

Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA gemischt und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Rad) gegeben. Der Elektroporator wurde auf eine Kapazität von 25 µF, einen Widerstand von 200 Ω und eine Transformationsspannung von 2,5 kV eingestellt. Die Zellen wurden in 500 µl 2×YT Medium aufgenommen und für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika.

2.2.9.4 Transformation von *E. coli* DH10Bac

Die chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µg des Transfer-Plasmids vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 sec bei 42°C wurden die Zellen für 5 min wieder auf Eis gegeben. Die Zellen wurden in 1 ml 2×YT Medium verdünnt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Zur Selektion wurden 10 µl, 1 µl und 0,1 µl in je insgesamt 100 µl 2×YT Medium verdünnt und auf Transpositionsplatten ausgestrichen.

Transpositionsplatten:	50 mg/ml	Kanamycin
	7 mg/ml	Gentamycin
	10 mg/ml	Tetracyclin
	300 mg/ml	X-Gal
	40 mg/ml	IPTG

LB-Festmedium wurde aufgekocht, bis auf Handwärme abgekühlt und anschließend supplementiert.

2.2.9.5 Transiente Transformation von BY2 Tabak-Protoplasten

Als Ausgangsmaterial diente eine Schüttelkultur 2 bis 3 Tage nach dem Verdünnen. 10 ml der Suspension, in welcher die Zellen in kleinen Aggregaten vorlagen, wurde über ein Nylonnetz (Gitterabstand 105 µm) filtriert und die zurückgehaltenen Zellen mit 10 ml einer 0,45 M Mannitlösung gewaschen. Die Zellen wurden mittels 10 ml Enzymlösung in eine Petrischale (Ø = 92 mm) überführt und unter sachtem Rotieren (60 rpm) für 2 h bei 28°C inkubiert. Die Protoplastensuspension wurde 1:1 mit W5-Medium verdünnt, in 15 ml-

Reaktionsgefäßen (Falcon) für 2 min bei 850 rpm abzentrifugiert. Die Pellets wurden sofort resuspendiert, vereinigt und für 2 min bei 850 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 3 ml MaMg-Medium resuspendiert und nach Auszählung unter einem Mikroskop auf eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen \cdot ml⁻¹ mit MaMg-Medium eingestellt.

330 µl der Protoplastensuspension wurde als Tropfen mittig auf einer Petrischale plaziert und mit 10 µg der Plasmid-DNA und 1 mg Heringsperma-DNA versetzt. Die Suspension wurde sukzessive mit 5 Tropfen von je 120 µl PEG-1500-Lösung vermischt (Maas *et al.*, 1995) und 20 min bei RT inkubiert. Die Transformation wurde gestoppt durch Zugabe von 1 ml und wiederum 9 ml W5-Medium, die Suspension in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und 4 min bei 850 rpm pelletiert. Die Zellen wurden sofort in 5 ml K₃S resuspendiert und in einer Petrischale (Ø = 60 mm) im Dunkeln bei 26°C für 24 h inkubiert. Nach einer 1:1-Verdünnung mit W5-Medium wurden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt von 4 min bei 850 rpm für die mikroskopische Analyse aufkonzentriert.

BY2-Suspensionskultur-Medium	4,3 g	Murashige and Skoog Plant Salt Base (Imperial Lab, 9-000-50)
	200 mg	KH ₂ PO ₄
	100 mg	myo-Inositol
	1 mg	Thiamin-HCl
	0,2 mg	2,4-D
	30 g	Succrose
	2 g	MES pH 5,8 mit KOH
Enzymlösung	1 % (w/v)	Cellulase Onozuka RS
	0,1 % (w/v)	Pectolyase
	0,4 M	Mannitol
		pH 5,5
W5-Medium	123 mM	NaCl
	100 mM	CaCl ₂
	4 mM	KCl
	5 mM	Saccharose
	0,1 % (w/v)	MES
		pH 5,8
MaMg-Medium	450 mM	Mannitol
	15 mM	MgCl ₂
	0,1 % (w/v)	MES
		pH 5,6
PEG-1500-Lösung	25 % (w/v)	PEG-1500
	0,1 M	MgCl ₂
	0,45 M	Mannitol
	20 mM	HEPES
		pH 6,0

Protoplasten-Kulturmedium (K₃S)

Macroelemente

KNO ₃	2500 mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	900 mg/l
NH ₄ NO ₃	250 mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250 mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	133 mg/l
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	150 mg/l
CaHPO ₄ ·H ₂ O	50 mg/l

Microelemente

MnSO ₄ ·H ₂ O	10 mg/l
H ₃ BO ₃	3 mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2 mg/l
KI	750 µg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25 µg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	25 µg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	25 µg/l

Vitamine

Thiamin·HCl	10 mg/l
Nikotinsäure	1 mg/l
Pyridoxin·HCl	1 mg/l

Hormone

NAA	1 mg/l
Kinetin	0,2 mg/l

Weitere Zusätze

Xylose	250 mg/l
myo-Inositol	100 mg/l
Na ₂ EDTA	37,2 mg/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8 mg/l
Saccharose	0,1 M, ca. 580 mOsmol·kg ⁻¹

pH 5,7 mit KOH

2.2.9.6 Pflanzentransformation

20 ml einer *A. tumefaciens* Übernachtskultur (YEB komplementiert mit Rifampicin, Gentamycin und Kanamycin) wurden in 500 ml YEB (komplementiert mit Kanamycin) verdünnt und bei 28°C ü. N. geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 5000 rpm für 15 min wurde das Pellet in 500 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Die Vakuuminfiltration erfolgte in einem Exsikkator bei Wasserstrahlvakuum für 10 bis 15 min. Die Pflanzen wurden umgekehrt in die Agrobaktériensuspension getaucht.

Nach der Infiltration wurden die Pflanzen im Gewächshaus weiter kultiviert. Die Pflanzen wurden zur Abreifung der Schoten mit Papiertüten überstülpt, sobald die ersten Samenkapseln braun wurden. Nach zwei Wochen konnten die Samen mit Hilfe eines Siebs gereinigt werden.

Infiltrationsmedium	2,15 g	Murashige und Skoog Basal-salt-mixture (Sigma)
	50 g	Saccharose
		pH 5,7 mit KOH; 20 min autoklavieren; Zugabe von B ₅ -Vitaminen und 44 µM BAP

Die Samen der T₀-Generation wurden sterilisiert und auf Petrischalen (Ø = 14,5 cm) mit ARA-Festmedium (komplementiert mit 15 µg·ml⁻¹ Hygromycin) verteilt. Die maximale Anzahl an Samen pro Platte betrug etwa 5000. Um ein Wachstum der Agrobakterien zu verhindern, enthielt das Medium zusätzlich 400 µg·ml⁻¹ Carbenicillin. Nach 10 bis 14 Tagen

wurden die resistenten Pflanzen (T_1) auf neue Platten umgesetzt und nach einer weiteren Woche schließlich in Erde überführt.

Jeweils 50 Samen der T_1 Pflanzen wurden wieder auf Platten mit Selektionsmedium ausgelegt. Diejenige Linien, die eine 3:1 Segregation zeigten (resistent:nicht-resistent), wurden weiter verwendet. Je 10 resistente Pflanzen (T_2) jeder dieser Platten wurden in Erde überführt.

Jeweils 50 Samen jeder T_2 Pflanze wurde erneut auf Platten mit Selektionsmedium ausgelegt. Homozygot waren die Pflanzen, die 100 % Resistenz zeigten (T_3).

2.2.10 Kultivierung von *A. thaliana* Pflanzen

2.2.10.1 Oberflächensterilisation

Die Sterilisierung der Samen erfolgte in 1,5 ml Eppendorfgefäßen. Die Samen (maximale Füllhöhe: 400 µl) wurden mit 1,0 ml Hypochloritlösung versetzt und 10 bis 15 min bei RT geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und die Samen dreimal mit je 1 ml 95 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die Samen trockneten ü. N. und wurden in den Eppendorfgefäßen gelagert.

Hypochloritlösung: 5 % (w/v) $\text{Ca}(\text{OCl})_2$; 0,02 % (v/v) Triton X-100; 80 % (v/v) Ethanol
Die Lösung wird 1 h gerührt; sie wurde erst dann verwendet, wenn das ungelöste $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ komplett sedimentierte.

2.2.10.2 Herstellung von Wurzelkulturen

Die Anzucht von *A. thaliana* Wurzelkulturen erfolgte in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 40 ml ARA-Flüssigmedium (siehe 2.1.11) und etwa 20 Samen. Die Kolben wurden in einer Kulturkammer (21°C, 16 h Photoperiode; $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ und 75 % Luftfeuchtigkeit) bei 80 rpm für 3 Wochen geschüttelt.

2.2.11 Qualitative Bestimmung der GUS-Aktivität

Setzlinge wurden in GUS-Puffer 8 h bis ü. N. bei 37°C inkubiert. Größere Pflanzen oder Pflanzenteile wurden zweimal 10 min im Exsikkator bei Wasserstrahlvakuum in GUS-Puffer infiltriert. Das Material wurde ü. N. in 70 % (v/v) Ethanol bei RT entfärbt und für einen weiteren Tag in H_2O bei RT rehydratisiert.

GUS-Puffer: 100 mM NaP_i ; 10 mM EDTA; 0,05 % (v/v) Triton X-100; pH 7,7
vor Gebrauch Zugabe von 50 µl X-Gluc-Lösung/10 ml Puffer
X-Gluc-Lösung: 100 mg X-Gluc/1 ml DMF

2.2.12 Immuncytochemie

2.2.12.1 Herstellung eines polyklonalen anti-AtKC1 Antikörpers

Der polyklonale anti-AtKC1 Antikörper ist gegen das cytoplasmatische C-terminale Ende des AtKC1 gerichtet. Die Expression des C-Terminus erfolgte als Fusion mit einem N-terminalen (His)₆-Tag in *E. coli* und das Fusionsprotein wurde zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (Reintanz, 1997).

Um aus dem anti-AtKC1 Antiserum die spezifischen Antikörper zu isolieren, wurde eine Affinitätssäulenchromatographie durchgeführt. Dazu wurden 8 Peptide aus dem C-terminalen Teil des AtKC1 abgeleitet, die einen hohen Antigenizitäts-Index (nach Jameson und Wolf) aufweisen:

Peptid Nr.	Aminosäure Sequenz
1	CSG - KGLNDELKK
2	CSG - EIPFLRDLLDDADAQ
3	CSG - TVQSEETPQSNDEE
4	CSG - TVSRHENGQIEER
5	CSG - IEERRREGVPK
6	C - QAPPNQDNKNNGDSNGR
7	CSG - EKKLGKRGST
8	CSG - QIDALRENDHLYI

Die Peptide wurden mit Hilfe eines automatischen Roboters zur Festphasenpeptidsynthese (Abimed, Langenfeld) auf Grundlage der Fmoc-Chemie hergestellt. Die Reinheit der isolierten Peptide wurde mittels HPLC überprüft.

Die Affinitätssäule wurde mit Hilfe des SulfoLink Kit (Pierce, Rockford) nach den Angaben des Herstellers präpariert: Die Peptide wurden kovalent über die freien Thiol-Gruppen der N-terminalen Cysteine an die immobilisierten Iodoacetyl-Gruppen der kreuzvernetzten Agarose-Matrix gekoppelt. Die Effizienz der Kopplung wurde mittels des Ellmans-Test (Bestimmung der freien Thiol-Gruppen) ermittelt. Freie Iodoacetyl-Gruppen wurden mit *L*-Cystein abgesättigt.

Zur Affinitätsaufreinigung des Antikörpers wurden 4 ml des Antiserums mit dem Säulenmaterial bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Säulenmatrix wurde 4 mal mit je 4 ml PBS gewaschen. Die saure Elution wurde mit 8 ml NaAc-Lösung durchgeführt, wobei der fraktionierte Säulendurchlauf mit 0,4 Vol. Tris-Lösung abgepuffert wurde. Nach einem Wasch-Schritt mit 10 ml PBS wurde die basische Elution mit 8 ml Ethanolamin-Lösung durchgeführt; der fraktionierte Säulendurchlauf wurde mit 0,4 Vol. NaAc-Lösung abgepuffert.

Die Fraktionen, die den Antikörper enthielten (2 Fraktionen der sauren Elution) wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert: 3 h gegen 1 l PBS und über Nacht gegen 5 l PBS. Zum Einengen der Antikörper-Lösung um Faktor 5 wurde gegen PEG-40000 dialysiert. Nach BCA-Test konnte die Antikörper-Lösung auf einen Protein-Gehalt von 0,385 mg·ml⁻¹ bestimmt werden.

2.2.12.2 Immuncytochemie an intakten Pflanzen

1 Woche alte *A. thaliana* Pflanzen wurden in Fixierlösung für zweimal 30 min im Wasserstrahlvakuum fixiert. Die Pflanzen wurden in Probenbehälter überführt und die weiteren Inkubationsschritte von dem InsituPro-Roboter (Abimed, Langenfeld) ausgeführt. Die Schritte verliefen wie folgt:

Waschen	5 × 12 min	0,1 % (v/v) Triton X-100 in MTSB
Waschen	5 × 12 min	0,1 % (v/v) Triton X-100
Zellwand permeabilisieren	30 min	2 % (w/v) Driselase in MTSB
Waschen	5 × 12 min	0,1 % (v/v) Triton X-100 in MTSB
Zellmembran permeabilisieren	2 × 30 min	10 % (v/v) DMSO; 3 % (v/v) NP-40 in MTSB
Waschen	5 × 12 min	0,1 % (v/v) Triton X-100 in MTSB
Blockieren	1 h	3 % (w/v) BSA in MTSB
Primärer Antikörper	4 h	anti-AtKC1 Antikörper (1:100) in Blockpuffer
Waschen	8 × 12 min	0,1 % (v/v) Triton X-100 in MTSB
Sekundärer Antikörper	3 h	FITC-Konjugat des anti-Kaninchen Antikörper (1:100) in Blockpuffer
Waschen	5 × 12 min	0,1 % (v/v) Triton X-100 in MTSB
Waschen	5 × 12 min	H ₂ O

Nach Abschluß des Programmes wurden die Keimlinge in 70 % (v/v) Glyzerol auf Objektträger gelegt und mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops die Fluoreszenzsignale beobachtet.

Fixierlösung: 4 % (w/v) Paraformaldehyd in MTSB
 20 ml einer 8 %igen Paraformaldehydlösung werden mit 20 µl 8 M KOH versetzt, 30 min auf 65°C erhitzt und mit 20 ml 2×MTSB versetzt.
 2×MTSB: 15 g PIPES; 1,9 g EGTA; 2,95 g MgSO₄·7H₂O; ad 500 ml H₂O; pH 7,0

2.2.12.3 Immuncytochemie an Insektenzellen

5×10⁵ Zellen wurden in 500 µl TNM-FH auf ein 20 mm × 20 mm großes Deckgläschen gegeben und 30 min bei RT inkubiert. Das Medium wurde durch 500 µl einer Viruslösung ersetzt (Infektion mit MOI 20) und die Zellen 1 h bei RT inkubiert. Die Viruslösung wurde ersetzt gegen 2 ml TNM-FH und die Zellen 36 h bei 27°C inkubiert.

Das Medium wurde abgenommen, die Zellen 3 mal in je 3 ml PBS gewaschen, 15 min bei -20°C fixiert und kurz an der Luft getrocknet. Die Zellen werden für 15 min in 2 ml PBS rehydratisiert, die Lösung gegen 3 ml Blockierlösung (5 % (v/v) FCS in PBS) ausgetauscht und für 1 h bei RT inkubiert. Der Erstantikörper wurde 1:100 in 1 % (v/v) FCS in PBS verdünnt, 100 µl dieser Lösung auf das Deckgläschen gegeben und für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden 3 mal mit je 3 ml PBS für je 15 min gewaschen. Der Zweitantikörper (FITC-Konjugat) wurde 1:100 in 1 % (w/v) FCS in PBS verdünnt, 100 µl dieser Lösung auf das Deckgläschen gegeben und für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden 3 mal mit je 3 ml PBS für je 15 min gewaschen, das Deckgläschen mit 20 µl DPX Einschlußmittel (BDH Lab Supplies) überschichtet und ohne Lufteinschluß umgekehrt auf einen Objektträger gelegt.

2.2.12.4 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Zur Lokalisierung von AtKC1 wurden einerseits GFP-Fusionskonstrukte, andererseits Fluorescein (FITC) gekoppelte Antikörper verwendet. Die Proben wurden untersucht: (1) mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica, DM RB) und einer CCD-Kamera (Hitachi, HV-C20A) oder (2) eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops (CLSM, Leica, DMIRBE, TCS 4D) mit implementierter digitaler Bildverarbeitung. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen, sowie die verwendeten Filter sind in Tabelle 2.1 zusammengestellt. Bei Verwendung des konfokalen Laserscanning-Mikroskops wurde die Hintergrund-Fluoreszenz der Pflanzengewebe mittels eines Langpass-Filters (580 nm) beobachtet; zur Bestimmung der Signalspezifität wurden FITC- und Autofluoreszenz-Aufnahmen mit Hilfe des Programms Photoshop 5.0 überlagert.

		Moleküleigenschaft		Filter	
		Anregung	Emission	Anregung	Emission
Leika DM RB	BY2-Zellen, GFP	488	506 ± 1	BP 470 ± 20	BP 538 ± 23
	Sf9-Zellen, FITC	494	518		
CLSM	<i>whole mount</i> , FITC				

Tabelle 2.1. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen sind in nm angegeben. In der Spalte "Filter" kürzt BP die Bezeichnung Bandpass-Filter ab. *)Bei Fluoreszenzaufnahmen mit Hilfe des konfokalen Laserscanning-Mikroskops wurde KrAr-Laser verwendet, so daß die Angabe des Anregungsfilters entfällt.

2.2.13 Insektenzellkultur und Herstellung rekombinanter Baculoviren

Der zur Expression in Sf9 Zellen vor allem verwendete Virus ist AcMNPV (*Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus); AcMNPV besitzt ein zirkuläres, doppelsträngiges Genom von etwa 130 kb Größe, welches in einem Nucleocapsid verpackt ist, das wiederum von einer Lipoproteinhülle (*envelope*) umschlossen wird. Dieses infektiöse Virion ist etwa 36 nm lang.

Zur Erzeugung rekombinanter Viren werden Transfervektoren verwendet, da die Größe des viralen Genoms keine direkte Manipulation, wie Klonierungen durch Behandlung mit Restriktionsendonukleasen und Ligasen, zuläßt. Das Gen von Interesse wird in einen Transfervektor kloniert, welcher neben dem Polyhedrin-Promotor (pPolh), dem SV40 Polyadenylierungssignal (SV40 polyA) und Selektionsmarkern (Ampicillin (Ap) und Gentamycin (Gm)) noch zwei Mini-Transposonelemente (Tn7) enthält, je eines rechts (Tn7R) und links (Tn7L) der Klonierungsstelle (s. Abb. 2.1). Die Transposition dieser Kassette in das virale Genom wird in *E. coli* vollzogen. Das virale Genom liegt im Stamm DH10Bac als Vektor niedriger Kopienzahl (Bacmid) vor. Das Bacmid ist dahingehend modifiziert, daß es zusätzlich für das lacZ α Peptid kodiert, welches - im Leseraster - die Tn7-Transposon Empfängerstellen beinhaltet (mini-*att*Tn7) und für Kanamycin-Resistenz kodiert. Zur Erhöhung der Transpositionseffizienz ist auf einem Helferplasmid eine Transposase kodiert; der Selektionsmarker ist in diesem Fall Tetracyclin. Die erfolgreiche Transposition der Expressionskassette in das Bacmid führt zu einer Unterbrechung des Leserasters des lacZ α Peptides, so daß die positiven Klone (rekombinante Bacmide) auf X-Gal und IPTG enthaltenden Kulturplatten farblos in einem Hintergrund blauer Kolonien erscheinen; dabei liegt die Transpositionsrate bei etwa 1:100 (transponierte zu nicht-transponierten).

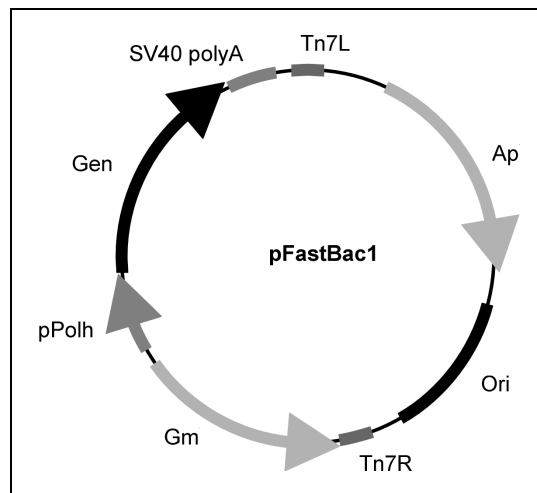


Abbildung 2.1. Schematische Darstellung des Transfervektors pFastBac1. Nähere Erläuterungen dazu im Text.

Mit der aus den positiven Klonen isolierten hochmolekularen Bacmid-DNA (s. 2.2.1.2) wurden mit Hilfe von liposomalen Reagenzien (CellFECTIN™, 1:1,5 (M:M) Lösung der kationischen Lipide TM-TPS und DOPE) Sf9 Zellen transfiziert (s. 2.2.13.3). Nach mehreren Amplifikationszyklen kann eine Stammlösung rekombinanter Viren von etwa 10^8 pfu/ml erreicht werden.

Die meist verwendeten Promotoren, der Polyhedrin- und der p10-Promotor, sind sehr spät im lytischen Infektionszyklus aktiv, d. h. etwa 20 bis 24 h p. i..

2.2.13.1 Insektenzellkultur

Die Insektenzellen (Sf9) wurden in Inkubationsschränken bei 27°C ohne zusätzliche Begasung kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank (LaminAir HA 2448 GS, Heraeus) ausgeführt. Die Zellkulturarbeiten wurden weitgehend nach den allgemein gebräuchlichen Methoden (King und Possee, 1992; O'Reilly *et al.*, 1992) ausgeführt.

Adhärente Kulturen

Die Insektenzellen wurden auf Zellkulturschalen (Falcon/Becton Dickinson, Franklin Lakes) mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² (T75) in TMN-FH Medium angezogen. Die Insektenzellkulturen wurden alle 3 bis 4 Tage geteilt, jeweils nach Erreichen von Konfluenz, d. h. die Zellen besetzen lückenlos den Kulturschalenboden in genau einer Zellschicht. Das Medium wurde abgesaugt, 5 ml neues, vorgewärmtes Medium zugefügt und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (Falcon/Becton Dickinson, Franklin Lakes) von der Kulturschalenoberfläche abgelöst. 0,9 ml (für viertägiges Wachstum) oder 1,3 ml (dreitägiges Wachstum) der Zellsuspension wurden in 12,5 ml frisches Medium verdünnt.

Suspensionskulturen

Eine T75-Kultur wurde in 50 ml TMN-FH, ergänzt durch 0,1 % (v/v) Pluronic F-68, in Spezialkulturflaschen (Techne, Oxford) verdünnt und erreichte nach 2 bis 3 Tagen eine Zelldichte von 10^6 Zellen/ml Medium.

Zur Expression eines rekombinanten Proteins wurde bei einer Zelldichte von $1,5$ bis 2×10^6 Zellen/ml Medium, zur Erzeugung einer Hochtitert-Virusstammlösung bei einer Zelldichte von $0,2$ bis $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml Medium infiziert.

Zellzahlbestimmung

10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl einer 10 % (w/v) TrypanBlau-PBS-Lösung (Sigma, München) versetzt und für 1 min bei RT inkubiert. 10 µl der Mischung wurde mit Hilfe eines Haemocytometers (verbesserte Neubauer-Zählkammer, Brand, Wertheim) ausgezählt, wobei der Mittelwert aus 4 verschiedenen Zählquadraten gebildet wurde. Abgestorbene Zellen zeigten eine starke Blaufärbung (Anreicherung des Farbstoffes) und konnten somit von den teilungsfähigen Zellen unterschieden werden.

2.2.13.2 Anlegen und Auftauen von Insektenzell-Stammlösungen

Insektenzell-Stammlösungen wurden in Cryovials (Nunc) in flüssigem Stickstoff gelagert (18XT-Gefäß, Taylor-Wharton, Indianapolis).

Auftauen von Insektenzellen

Die Zellen (10^7 in 1 ml Einfriermedium) wurden schnell in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut und in 4 ml vorgewärmtes Medium in einer Zellkulturschale mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² gegeben. Nach 30 min hatten sich die intakten Zellen angeheftet und das Medium wurde gewechselt. Nach 24 h wurde nochmals gegen frisches Medium ausgetauscht. Nach 2 bis 3 d (Erreichen der Konfluenz) wurden die Zellen resuspendiert, geteilt und in zwei T75-Schalen verdünnt.

Einfrieren von Insektenzellen

100 ml einer Suspensionskultur wurden bis zu einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ml Medium angezogen. Die Zellen wurden bei 500×g und RT für 10 min zentrifugiert und in 10 ml Einfriermedium (Dichte: 10^7 Zellen/ml) resuspendiert. Die Zellstammlösung wurde zu je 1 ml in Cryovials aliquotiert, für 1 h auf -20°C heruntergekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium	0,6 Vol. GRACES Medium
	0,3 Vol. FCS
	0,1 Vol. DMSO

2.2.13.3 Transfektion von Insektenzellen mit Bacmid-DNA

Sf9-Zellen wurden durch liposomenvermittelte Transfektion transformiert.

$2,5 \times 10^6$ Zellen wurden in 2 ml TNM-FH auf eine Petrischale (Ø 60 mm) aufgebracht und 45 min inkubiert. 5 µl der Bacmid-DNA (siehe 2.2.1.2) wurden mit 5 µl CellFECTIN™ in je 100 µl GRACES Medium gemischt, 45 min bei RT inkubiert und anschließend mit Grace's Medium auf 1 ml gebracht. Die Zellen wurden zweimal mit je 2 ml Grace's Medium gewaschen und mit der Bacmid-CellFECTIN™-Mischung versetzt. Die Zellen wurden 4 h bei 27°C inkubiert, anschließend mit 2 ml TNM-FH versetzt und 3 d bei 27°C inkubiert. Die Zellen wurden im Medium resuspendiert, bei 800×g für 5 min bei RT zentrifugiert und der Transfektionsüberstand bei 4°C gelagert.

2.2.13.4 Herstellung von Hochtiter-Virusstammlösungen

5×10^6 Zellen wurden in 5 ml TNM-FH in einer Zellkulturschale mit einer Wachstumsfläche von 25 cm^2 verdünnt, mit 1 ml des Transfektionsüberstandes (siehe 2.2.13.3) versetzt und 5 bis 7 d bis zur vollständigen Lyse der Zellen bei 27°C inkubiert (P1-Virusstammlösung). Die Zellsuspension wurde in eine Suspensionskultur von 100 bis 250 ml mit einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ml Medium verdünnt. Die Zellsuspension wurde 7 bis 9 d bei 27°C inkubiert, so daß die Vitalität der Zellkultur abschließend bei unter 5 % lag; die Zellen wurden durch Zentrifugation bei $1000 \times g$ und RT für 20 min pelletiert und die Virusstammlösung in 50 ml Aliquots bei 4°C gelagert (P3-Virusstammlösung).

2.2.13.5 Bestimmung des viralen Titers (Plaque-Assay)

Um den Titer einer Virusstammlösung zu quantifizieren, wurden 2 Verdünnungen (10^{-6} und 10^{-7}) *in duplica* analysiert.

Je Petrischale wurden 10^7 Zellen in 5 ml TNM-FH verdünnt, gleichmäßig auf der Schalenoberfläche verteilt und die Zellen für 30 min bei 27°C inkubiert. 3 ml des Mediums wurden abgenommen und 1 ml der Verdünnungsreihe zugegeben. Die Zellen wurden für 1 h bei 27°C inkubiert, das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml eines Agarose-Medium-Mix von etwa 30°C vorsichtig überschichtet. Die Zellen wurden 5 d bei 27°C inkubiert und anschließend mit einem Agarose-Medium-Mix, dem 0,025 % (w/v) NeutralRot (Sigma, München) zugesetzt war, überschichtet. Nach einer Übernachtinkubation konnten die Plaques als opaleszente Punkte vor einem roten Hintergrund ausgezählt werden. Der Titer wurde berechnet als {Zahl der Plaques}/Verdünnung = $\text{pfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ und betrug im Schnitt etwa $10^8 \text{ pfu} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Agarose-Medium-Mix: 2,5 % (w/v) Low-Melting Agarose; nach dem Sterilisieren auf 47°C gehalten und mit TNM-FH Medium gleicher Temperatur 1:1 gemischt.
Kurz vor dem Überschichten der Platten werden 5 ml der 1:1-Mischung mit 5 ml TNM-FH Medium von RT schnell gemischt und aufgetragen.

2.2.14 Elektrophysiologische Methoden

Ionenkanälen werden häufig in heterologen Expressionssystem elektrophysiologisch untersucht. Die heterologen Systeme bieten verschiedene Vorteile: Die Zellen sind den Elektroden leicht zugänglich, die Menge des rekombinanten Proteins ist hoch, es können definierte Lösungen zugegeben werden und es sind meist keine endogenen Kanäle vorhanden, die ein spannungsabhängiges Verhalten zeigen. Nachteilig sind vor allem Probleme bei der intrazellulären Lokalisierung, Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation und fehlende Partneruntereinheiten.

In der vorliegenden Arbeit wird die Aktivität und Funktionalität der heterolog exprimierten K^+ -Kanäle mittels der *patch clamp*-Technik untersucht. Auf eine zu untersuchende Zelle wird eine äußerst kleine Glaspipette aufgesetzt. Durch Anlegen eines leichten, temporären Unterdruckes wird ein Areal der Zellmembran (einige μm^2 , *patch*) in die Pipette gezogen, welches sich eng an die Wand der Pipettenöffnung anschmiegt. Dadurch wird ein sehr hoher Widerstand (bis zu mehreren Gigaohm, *giga seal*) erzeugt und es können extrem kleine Ströme (im nA- bis pA-Bereich) über die Membran hinweg gemessen werden (Abb. 2.2, a).

In dieser Versuchsanordnung (*cell-attached*) können durch Einzelkanäle vermittelte Ströme meßtechnisch aufgelöst werden. Wird nun kurzzeitig ein starker Unterdruck angelegt, so reißt das Membranstück in der Pipettenspitze, während die Verbindung zwischen der verbliebenen Membran und der Glaswand erhalten bleibt (Abb. 2.2, b). In dieser Konfiguration (Ganzzell-Ableitung oder auch *whole-cell*) können die Ionenströme über die gesamte Zellmembran vermessen werden; die Lösung der Pipette und des Cytosols diffundieren dabei ineinander, so daß nach einigen Minuten das Cytosol wegen des geringen Volumens praktisch gegen die Pipettenlösung ausgetauscht ist.

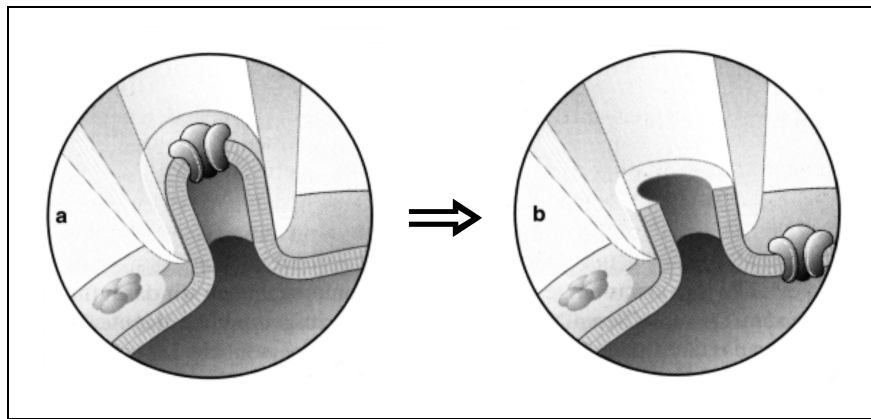


Abbildung 2.2. Schematische Darstellung verschiedener Patch-Konfigurationen. Dargestellt sind: (a) *cell-attached*-Konfiguration; das Membranareal mit einem Ionenkanal unter der Pipettenöffnung schmiegte sich an die Glaswände der Pipette an, so daß sich ein hochohmiger Widerstand ausbildet. (b) Ganzzell-Ableitung oder *whole-cell*-Konfiguration, welche sich nach Durchbruch der Membran durch einen kurzzeitigen Unterdruck ergibt. Die Membran ist weiterhin in engem Kontakt mit der Pipette, der Zellinnenraum jedoch geöffnet. Die Abbildung ist entnommen aus M. Numberger und A. Draguhn; Patch-Clamp-Technik, 1996, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg

Zur eigentlichen Messung wird eine zweite Elektrode in das Badmedium getaucht, so daß über einen Verstärker ein geschlossener Stromkreis gebildet wird. In den meisten Messungen wird die Spannung vorgegeben (*voltage clamp*) und der resultierende Strom der Zelle auf die angelegte Membranspannung registriert; durch den Meßverstärker wird der Strom I aufgezeichnet, welcher über die Zellmembran hinweg fließt.

Für die funktionelle Analyse von Ionenkanälen werden häufig als heterologes Expressionssystem Oozyten des südamerikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* verwendet. Die cDNA wird dabei *in vitro* transkribiert und diese cRNA in die isolierten Oozyten injiziert. Nach einigen Tagen werden die derart behandelten Oozyten durch *patch clamp*-Analyse untersucht.

Zur Charakterisierung von Ionenkanälen wird häufig ein so genanntes Strom-Spannungs-Diagramm (I/U-Kurve) aufgenommen. In einem Patch-Clamp-Experiment wird dabei von einer Haltespannung ausgehend sukzessive zu einem Membranpotential gesprungen, welches bei jedem neuerlichen Durchlaufen des Spannungsprotokolls um ein bestimmtes Inkrement verändert wird (Abb. 2.3, A). Die registrierte Stromantwort der Zelle (Abb. 2.3, B) wird dann - bei nicht inaktivierenden Ionenkanälen - über den konstanten Bereich (*steady state*) gemittelt und die Stromstärke in Abhängigkeit von der angelegten Membranspannung in einem I/U-Diagramm aufgetragen (Abb. 2.3, C). In dem dargestellten Beispiel wird bei hyperpolarisierenden Membranpotentialen ein negativer Strom gemessen. Ein Einstrom von Kationen und/oder einen Ausstrom von Anionen wird nach Konvention als negativer Strom definiert (Hodgkin und Katz, 1949).

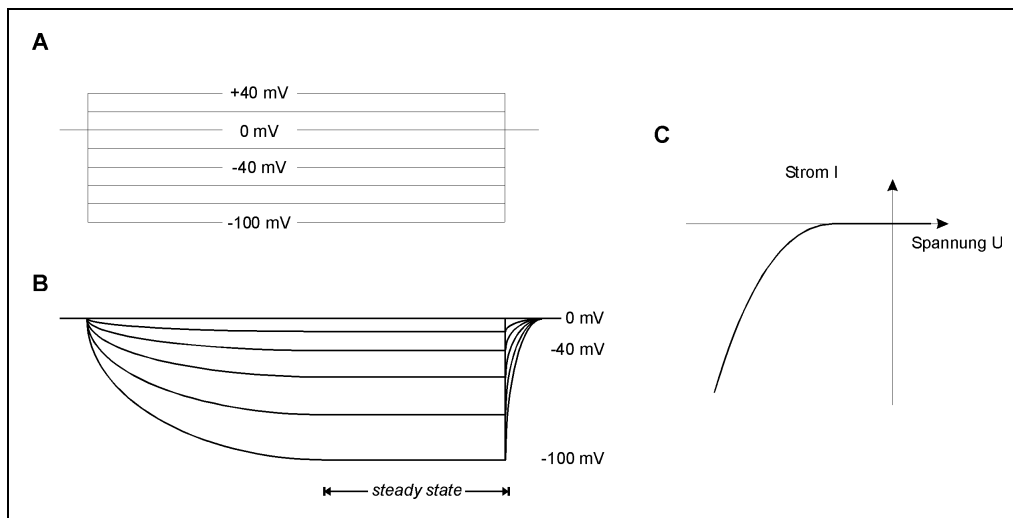


Abbildung 2.3. Schematisch dargestellt sind: (A) Das Pulsprotokoll, nach welchem das Meßgerät das Membranpotential vorgibt (Von einem Haltepotential von 0 mV wird eine Spannung von 40 mV vorgegeben und anschließend wieder auf das Ruhepotential zurückgegangen; im nächsten Schritt wird auf eine Spannung von 20 mV gesprungen, usw.). (B) Der vom Meßverstärker registrierte Strom; zur Auswertung wird über den *steady state*-Bereich gemittelt. (C) Im I/U-Graphen wird der gemessene Strom I gegen die angelegte Spannung U aufgetragen; im angegebenen Beispiel öffnet der Kanal bei etwa -20 mV und es wird ein negativer Strom gemessen.

Um die für den gemessenen Strom verantwortlichen transportierten Ionen zu bestimmen, wird die *tail current*-Analyse herangezogen. In einem Vorpuls werden die Ionenkanäle der Zellmembran maximal geöffnet (Abb. 2.4 A); in einem darauffolgenden Potentialsprung wird nun der Ionentransport durch die, nur zu Beginn des Sprunges, geöffneten Kanäle auch bei solchen Spannungen gemessen, bei denen die Ionenkanäle eigentlich geschlossen sind (Abb. 2.4 B). Derart wird das Umkehr-Potential (*reversal potential*, E_{rev}) bestimmt, also das Potential, bei welchem kein Nettostrom meßbar ist (Abb. 2.4 C). Bei Kenntnis der cytosolischen und extrazellulären Ionenkonzentrationen kann mit Hilfe der NERNSTschen Gleichung das Gleichgewichtspotential (z. B. für Kalium E_K) berechnet werden, bei welchem kein Netto-Ionenfluß einer bestimmten Ionensorte mehr meßbar sein sollte. Es ist gegeben als

$$E_K = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[K^+]_{ex}}{[K^+]_{cyt}}$$

Gilt für mindestens zwei unterschiedliche extrazelluläre K^+ -Konzentrationen $E_{rev} = E_K$, so kann gesagt werden, daß ein untersuchter Ionenkanal für Kaliumionen selektiv permeabel ist.

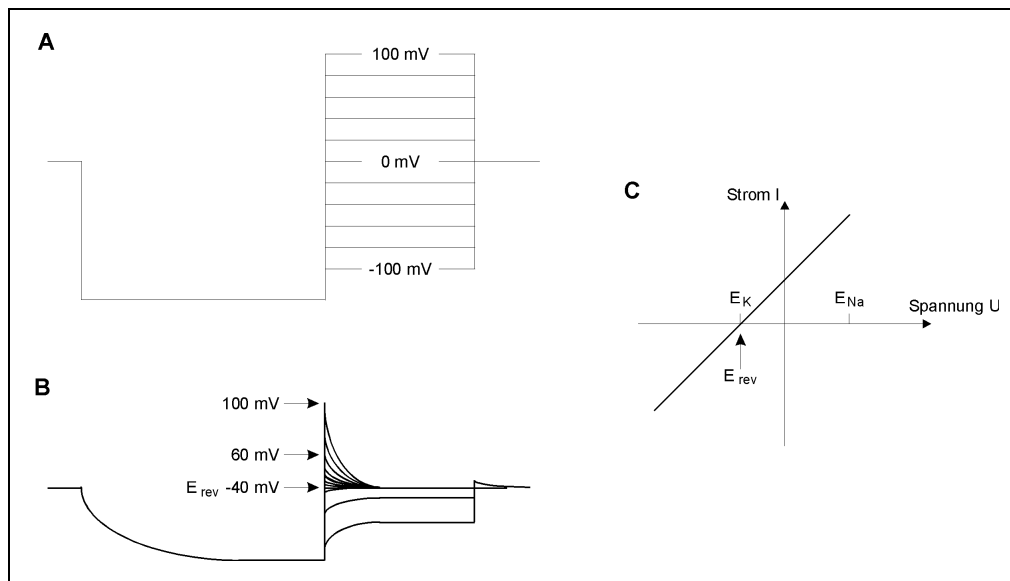


Abbildung 2.4. Schematisch dargestellt ist die *tail current* Analyse. (A) Das Pulsprotokoll, nach welchem das Meßgerät das Membranpotential vorgibt (Im Beispiel wird von einer Haltespannung von 0 mV ausgehend zur maximalen Kanalöffnung eine Spannung von -120 mV angelegt, anschließend ein Membranpotential von 100 mV, welches im weiteren Verlauf des Experimentes in Inkrementen von 20 mV reduziert wird; abschließend wird wieder auf die Haltespannung zurückgegangen.). (B) Der vom Meßverstärker registrierte Strom; zur Auswertung wird der Strom bestimmt, welcher genau zu Beginn des zweiten, variablen Potentialsprunges auftritt. Im Beispiel wird bei einem Membranpotential von -40 mV kein Nettostrom gemessen; das Umkehrpotential $E_{rev} = -40$ mV. (C) Im I/U-Graphen wird der ermittelte Strom I gegen die angelegte Spannung U aufgetragen; im angegebenen Beispiel ist das Umkehr-Potential gleich dem NERNST-Potential für Kalium ($E_{rev} = E_K$), während das NERNST-Potential für Natrium bei positiverem Potential liegt: Wird z. B. für die Konzentrationen in der Zelle $[K^+]_{cyt} = 100$ mM und $[Na^+]_{cyt} = 10$ mM und für die extrazelluläre Lösung $[K^+]_{ex} = 10$ mM und $[Na^+]_{ex} = 100$ mM angenommen, so ergeben sich die Gleichgewichtspotentiale nach der NERNSTschen Gleichung zu $E_K = -59$ mV und $E_{Na} = +59$ mV.

2.2.14.1 patch clamp-Analyse an Sf9-Zellen

Pipettenkapillaren (Hilgenberg-Kapillare mit Filament) wurden mit Hilfe eines DMZ-Universal Pullers (Zeitz-Instrumente, München) mit Glühfilament in ihrer Mitte auseinandergezogen und getrennt und die Pipettenspitze mit einem CDZ-100 Pipette Forge (List-Medical, Darmstadt-Eberstadt) poliert. Die Pipette wurde mit durch eine $0,22 \mu\text{m}$ -Membran gefilterten Pipettenlösung befüllt und sofort eingesetzt.

Deckgläschen ($\varnothing = 14$ mm) wurden abgeflämmt, in Zellkulturschalen (Nunc Multischalen mit 4 Vertiefungen, NalgeneNunc, Wiesbaden-Biebrich) abgelegt und mit 1 ml TNM-FH überschichtet. 3×10^4 Zellen wurden in den vorbereiteten Kulturschalen ausgebracht, mit dem rekombinanten Virus bei einer MOI 10 infiziert und für 24 h bis 48 h bei 27°C inkubiert. Unmittelbar vor dem Experiment wurde das Deckgläschen mit den adhären Zellen der Kulturschale entnommen und einmal in Badlösung gewaschen.

Mit Hilfe eines Mikromanipulators (Combi 25, Luigs & Neumann GmbH, Darmstadt-Eberstadt) wurde die Pipettenspitze an die Zelle angenähert, wobei ein leichter Überdruck in der Pipette dafür sorgte, daß diese nicht verunreinigte oder verstopfte. Nach Rücknahme des Überdrucks wurde ein Membranareal in die Pipettenspitze gesaugt und es bildete sich der beschriebene hochohmige Verschluß zwischen Membran und Pipettenglas aus.

Nach automatischer Abgleichung der kapazitiven Ströme wurde durch kurzen Unterdruck vom *cell attached* in den *whole cell*-Modus übergegangen. Die Spannungsprotokolle wurden computergesteuert (Software PULSE V8.40, Heka Elektronik Dr. Schulze GmbH,

Lambrecht) vorgegeben und die Stromantwort der Zelle nach Amplifikation (EPC 9 patch clamp Amplifier, Heka Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht) aufgezeichnet und ausgewertet. Auftretende sogenannte *liquid junction potentials* wurden theoretisch berechnet und automatisch korrigiert (Barry und Lynch, 1991).

Zur *patch clamp*-Analyse an Sf9-Zellen wurden folgende Medien verwendet:

Badlösung	10 mM	KCl
	120 mM	NaCl
	3 mM	MgCl ₂
	1 mM	CaCl ₂
	10 mM	MES
	5 mM	Glukose
	125 mM	Sorbitol
	1,3 mM	TRIS
		pH 6,3
		Osmolarität 410 mosmol kg ⁻¹
Pipettenlösung	120 mM	KCl
	10 mM	NaCl
	3 mM	MgCl ₂
	1 mM	CaCl ₂
	10 mM	HEPES
	5 mM	Glukose
	125 mM	Sorbitol
	1 mM	TRIS
		pH 7,4
		Osmolarität 400 mosmol kg ⁻¹

2.2.14.2 *patch clamp*-Analyse an *X. laevis* Oozyten

Oozyten wurden wie beschrieben isoliert (Becker, 1995) und die rekombinante cRNA injiziert (Brüggemann *et al.*, 1999)

Zur elektrophysiologischen Untersuchung wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik verwendet: Zwei Elektroden werden in die Oozyte eingestochen. Die Pipetten besitzen einen extrem kleinen Öffnungsdurchmesser ($\leq 1 \mu\text{m}$), so daß ein Auslaufen der Pipettenlösung (3 M KCl) weitgehend verhindert wird. Die Potentialelektrode mißt das Membranpotential zwischen Oozyte und Badlösung und gibt das Signal an einen Meßverstärker weiter. Zum Abgleich der Differenz zwischen der Membranspannung und der Kommandospannung wird über die Stromelektrode ein dieser Spannungsdifferenz proportionaler Strom in die Zelle geleitet, so daß gemessenes Membranpotential und Kommandospannung identisch sind. Der eingespeiste Strom entspricht dem über die Membran fließenden Strom und ist damit direkt proportional zur Leitfähigkeit der Membran und somit zur Aktivität der in der Membran befindlichen Ionenkanäle.

Zur *patch clamp*-Analyse an *X. laevis* Oozyten wurden folgende Badmedien verwendet:

zur Messung bei unterschiedlichen K⁺-Konzentration

10 mM K ⁺	10 mM	KCl
	1 mM	CaCl ₂
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	MES/TRIS
		pH 5,6

30 mM K ⁺	30 mM	KCl
	1 mM	CaCl ₂
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	MES/TRIS
		pH 5,6

100 mM K ⁺	100 mM	KCl
	1 mM	CaCl ₂
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	MES/TRIS
		pH 5,6

zur Messung bei unterschiedlichen externen pH-Werten

pH 4,5	30 mM	KCl
	1 mM	CaCl ₂
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	MES/TRIS
		pH 4,5

pH 5,6	30 mM	KCl
	1 mM	CaCl ₂
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	MES/TRIS
		pH 5,6

pH 7,5	30 mM	KCl
	1 mM	CaCl ₂
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	TRIS/MES
		pH 7,5

zur Messung von unterschiedlichen internen pH-Werten

ohne Natriumacetat	30 mM	KCl
	1 mM	CaCl ₂
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	MES/TRIS
		pH 5,6

mit Natriumacetat	5 mM	Natriumacetat
	30 mM	KCl
	1 mM	CaCl ₂
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	MES/TRIS
		pH 5,6

zur Messung der relativen Permeabilitäten

NH ₄ ⁺	100 mM	NH ₄ ⁺ Cl
	1 mM	CaCl ₂
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	MES/TRIS
		pH 5,6

Rb ⁺	100 mM	RbCl
	1 mM	CaCl ₂
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	MES/TRIS pH 5,6
Li ⁺	100 mM	LiCl
	1 mM	CaCl ₂
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	MES/TRIS pH 5,6
Na ⁺	100 mM	NaCl
	1 mM	CaCl ₂
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	MES/TRIS pH 5,6

“Und Ihr”, bohrte ich weiter mit kindischer Impertinenz,
“Ihr begeht nie Irrtümer?”
“Oft”, strahlte er mich an, “aber statt immer nur ein und denselben zu konzipieren, stelle ich mir lieber viele vor und werde so der Sklave von keinem.”

3 Ergebnisse

Der Ergebnissteil gliedert sich in zwei Abschnitte: Im ersten Teil werden die Ergebnisse der Experimente zur Charakterisierung der AtKC1- α -Untereinheit beschrieben, die Studien zur Lokalisierung, der heterologen Expression, der Identifizierung von zwei Nullmutanten und der elektrophysiologischen Analyse. Im zweiten Teil werden die Untersuchungen zur KAT2- α -Untereinheit dargestellt, die Studien zur Lokalisierung und der elektrophysiologischen Analyse.

3.1 Charakterisierung der Kaliumkanal- α -Untereinheit AtKC1

3.1.1 Subzelluläre Lokalisation des AtKC1-Proteins

Bisherige Untersuchungen zur Lokalisation der AtKC1- α -Untereinheit durch Promotor-GUS-Studien zeigten Expression vor allem in der Wurzel. Um Aussagen zur Funktion machen zu können, ist die Lokalisation innerhalb der Zelle entscheidend. Daher sollte durch Westernblot-Analyse von FFE-Membranfraktionen der subzelluläre Wirkort von AtKC1 bestimmt werden.

3.1.1.1 Westernblot-Analysen von Membranfraktionen

Die durch differenzielle Zentrifugation isolierten mikrosomalen Präparationen sind Mischfraktionen aus Plasmamembranen, ER- und Golgimembranen und Tonoplasten. Auf Grund der verschiedenen membranständigen Proteine besitzen unterschiedliche Zellmembranen verschiedene Eigenschaften, die zu ihrer weiteren Separierung genutzt werden können. Durch *Freeflow*-Elektrophorese (FFE) werden die Membranvesikel nach

Durchlaufen eines elektrischen Feldes bezüglich ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt, so daß sich vor allem 3 unterschiedliche Membranfraktionen isolieren lassen (s. Abb. 3.1 A): (a) Plasmamembranen (c) ER- und nukleäre Membranen und (e) Tonoplasten, sowie drei weitere Zwischenfraktionen (b, d und f). Proben dieser Membranfraktionen wurden im Labor von Prof. Canut isoliert und durch Enzymassays und Westernblot-Analysen charakterisiert (Bardy *et al.*, 1998; Canut *et al.*, 1996).

In einem Westernblot-Experiment wurden je Fraktion 50 µg Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Als Erstantikörper wurden anti-AtKC1-Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung eingesetzt. Eine Hauptbande konnte bei einer Größe von etwa 76 kDa detektiert werden, die fast ausschließlich in Fraktion A und B auftrat, also in der Plasmamembran-Fraktion (s. Abb. 3.1 B). Darüber hinaus wurde bei einer apparenten Molekularmasse von etwa 33 kDa ein weiteres Signal detektiert, welches möglicherweise einem N-terminalen Abbauprodukt von AtKC1 entspricht; die Stärke des 33 kDa-Signals nahm über einen Zeitraum etwa 2 Monaten zu, während sich jenes bei einer Größe von 76 kDa reduzierte (s. dazu Abb. 3.7)

Um die Identität der ER-Membranfraktionen zu bestätigen, wurden Antikörper (Feckler, 2000) gegen ein membranassoziiertes Protein des ER, AtERabp1, verwendet (s. Abb. 3.1 C; Palme *et al.*, 1992).

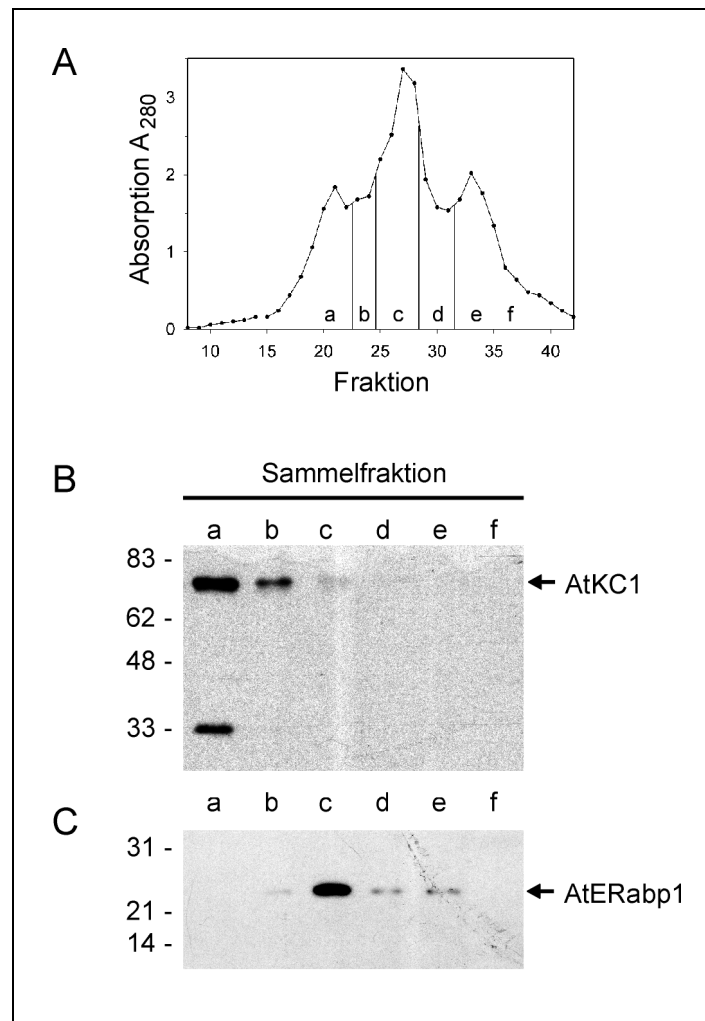


Abbildung 3.1. Westernblot-Analyse der durch *Freeflow*-Elektrophorese gewonnenen Membranfraktionen. (A) Gezeigt ist die Auftragung der Proteinkonzentration (angegeben als Absorption bei einer Wellenlänge $\lambda = 280$ nm) gegen die Einzelfractionen. Eingefügt sind die jeweils vereinten Sammelfractionen mit den Hauptfractionen (a, c und e) und den Übergangsfractionen (b, d und f). (B) Westernblot-Analyse für AtKC1. Auf der linken Seite ist der Molekulare Massenstandard angegeben, auf der rechten Seite durch einen Pfeil das Signal, welches der molekularen Masse des AtKC1 entspricht. Erstantikörper: anti-AtKC1 Antikörper, 1:5000 Verdünnung. 10 % Gel, reduzierende Bedingungen. (C) Westernblot Analyse nach Inkubation mit dem anti-AtERabp1-Antikörper. 15 % Gel, reduzierende Bedingungen. (B) und (C) Zweitantikörper: anti-Kaninchen-Antikörper, 1:20000 Verdünnung.

Durch Analyse der durch *Freeflow*-Elektrophorese aufgetrennten Membranfraktionen konnte gezeigt werden, daß AtKC1 in Wurzeln an die Plasmamembran transportiert wird.

3.1.1.2 Homologe Expression in *A. thaliana*

Um die subzelluläre Lokalisierung von AtKC1 *in planta* zu zeigen, sollten transgene *A. thaliana* Pflanzen hergestellt werden, die eine translationale Fusion aus AtKC1 und GFP unter der Kontrolle des konstitutionellen *CaMV* 35S Promotors tragen.

Das AtKC1::GFP-Fusionskonstrukt wurde aus dem Vektor pUC18 35S-AtKC1::GFP-pA in den Vektor pVKH kloniert (beide Vektorkarten: s. Anhang 6.1) und *A. thaliana*-Pflanzen durch Agrobakterien transformiert.

Nach Untersuchung der Hygromycin-resistenten Pflanzen konnte jedoch kein GFP-spezifisches Fluoreszenz-Signal detektiert werden. Es kann vermutet werden, daß die Expression von AtKC1 strikt reguliert wird. Somit könnte es möglich sein, daß eine minimale Fusionsprotein-Menge, die die Beobachtung von GFP-spezifischen Fluoreszenz-Signalen gestattet, nicht erreicht wurde.

3.1.2 Heterologe Expression von AtKC1

3.1.2.1 Expression in Sf9-Insektzellen

Die Expression in Insektzellen durch baculovirusvermittelte Infektion zeichnet sich vor allem durch hohe Expressionsraten und typische eukariontische, post-translationale Modifikationen aus (zum Baculovirus-Insektzell-System vgl. a. 2.2.13).

Die Expression von Kaliumkanal- α -Untereinheiten in Insektzellen und deren elektrophysiologische Untersuchung wurde erstmals von Gaymard *et al.* (1996) beschrieben. Zimmermann *et al.* (1998) konnten darüber hinaus durch GFP-Fusionsproteine eine Membranlokalisierung des funktionellen Kanals (SKT1 und KST1) in Insektzellen zeigen.

3.1.2.1.1 Expression von AtKC1

Aufgrund der Daten, die eine korrekte Lokalisierung von K^+ -Kanal- α -Untereinheiten belegten, sollte mit Hilfe des Baculovirus-Systems AtKC1 ebenfalls in Sf9-Insektzellen exprimiert werden, um durch elektrophysiologische Messungen die Funktionalität von AtKC1 als K^+ -Kanal zu zeigen. Die *AtKC1*-cDNA wurde in den Vektor pFastBac1 kloniert (Vektorkarte im Anhang 6.1) und anschließend rekombinante Viren hergestellt. Nach Amplifikation des Virus (s. 2.2.13.4) wurde der Titer durch einen Plaque-Assay (s. 2.2.13.5) auf etwa 10^8 pfu·ml⁻¹ bestimmt.

Für die elektrophysiologischen Experimente wurden Sf9 Zellen auf Deckgläschen aufgebracht, mit den rekombinanten Viren infiziert und nach 24 bis 48 h vermessen. Wurde die Inkubationszeit auf über 48 h p.i. verlängert, zeigten die infizierten Zellen deutlich

unstabilere Membranen unter hyperpolarisierenden Bedingungen. In drei unabhängigen Experimenten, wobei an jeweils 8 bis 10 Zellen gemessen wurde, konnte kein spannungsabhängiger Strom über die Zellmembran festgestellt werden (Abb. 3.2 A).

Parallel wurden als Kontrolle Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren infiziert, die die *KAT1*-cDNA enthielten. Hier konnten nach etwa 24 h p. i. erste spannungsabhängige K^+ _{in}-Ströme gemessen werden (Abb. 3.2 B).

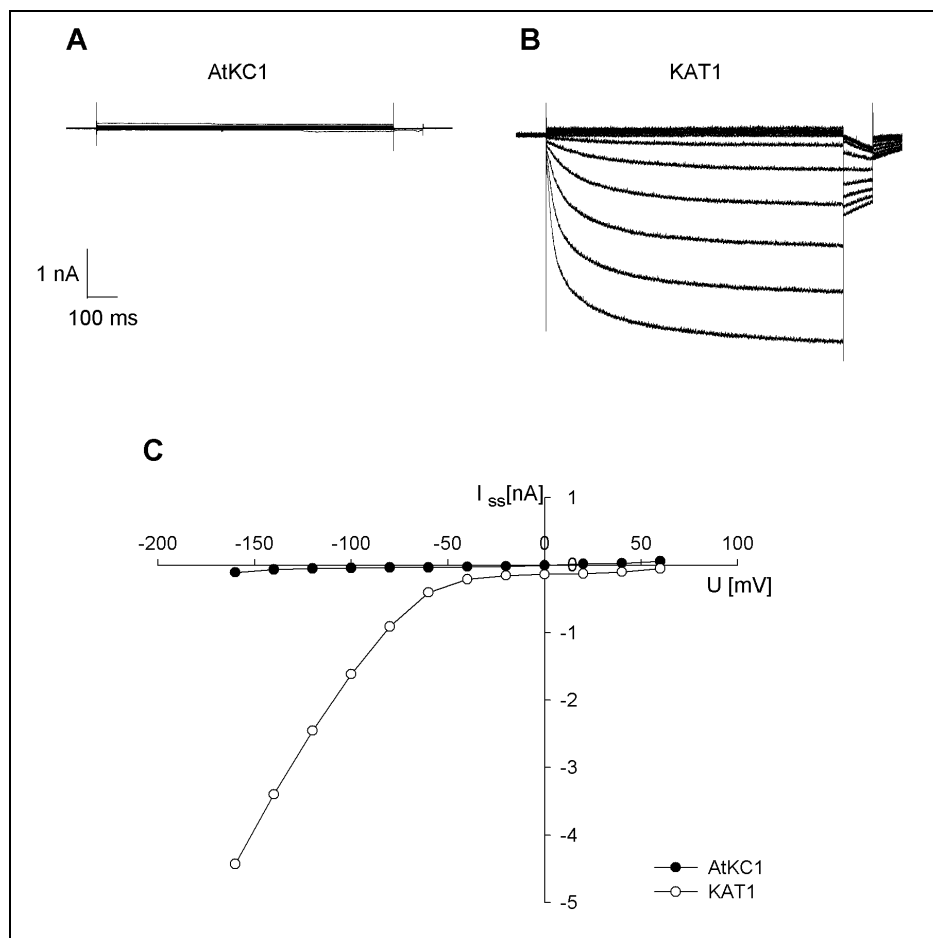


Abbildung 3.2. *Patch clamp*-Analyse in der Ganzzell-Ableitung von Sf9-Zellen nach Infektion mit vir-AtKC1 und vir-KAT1. Gezeigt sind die Stromspuren von mit vir-AtKC1 (A) und mit vir-KAT1 (B) infizierten Sf9-Zellen. (C) Im I/U-Diagramm sind die *steady state*-Stromstärken gegen das angelegte Membranpotential aufgetragen (● AtKC1; ° KAT1). Gezeigt sind typische Stromspuren und das dazugehörige I/U-Diagramm.

Die mit vir-AtKC1 infizierten Sf9-Zellen zeigten in der *patch clamp*-Analyse einen ähnlichen Strom-Spannungsverlauf wie nicht-infizierte Sf9-Zellen (nicht gezeigt). Um sicherzustellen, daß AtKC1 synthetisiert wird, wurde die Expression von AtKC1 in Sf9-Zellen durch Westernblot-Analyse nachgewiesen (s. Abb. 3.6). Nach etwa 60 h p.i. wurden

die mit vir-AtKC1 infizierten Zellen isoliert und das Ganzzelllysate durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die apparente molekulare Masse des detektierten, rekombinanten Proteins von etwa 76 kDa entspricht der theoretisch vorhergesagten des nativen Proteins von 75,6 kDa (vgl. Abb. 3.7). Das rekombinante AtKC1-Protein konnten bereits nach etwa 24 h p.i. in infizierten Sf9-Zellen nachgewiesen werden, wobei das Signal schwach war (nicht gezeigt).

Für das Fehlen eines AtKC1-vermittelten Stroms in Insektenzellen sind folgende Erklärungen wahrscheinlich: i) AtKC1 wird zwar exprimiert, jedoch erfolgt keine Translokation an die Plasmamembran. ii) AtKC1 wird zwar an die Plasmamembran transportiert, es fehlen jedoch zur Funktionalität wichtige, pflanzenspezifische Hilfsfaktoren, die nicht von den Sf9-Insektenzellen zur Verfügung gestellt werden.

Um die erste Frage zu klären, wurden Insektenzellen mit vir-AtKC1 infiziert, nach 36 h fixiert und immunocytochemisch analysiert. Das AtKC1-Protein ist ausschließlich im ER lokalisiert (Abb. 3.3 A).

Durch eine Positivkontrolle, die Expression des integralen Membranproteins AtPIN1, konnte die Plasmamembranlokalisierung eines rekombinanten, pflanzlichen Proteins in Sf9 Zellen gezeigt werden (O. Tietz, unveröffentlicht, s. Abb. 3.3 B).

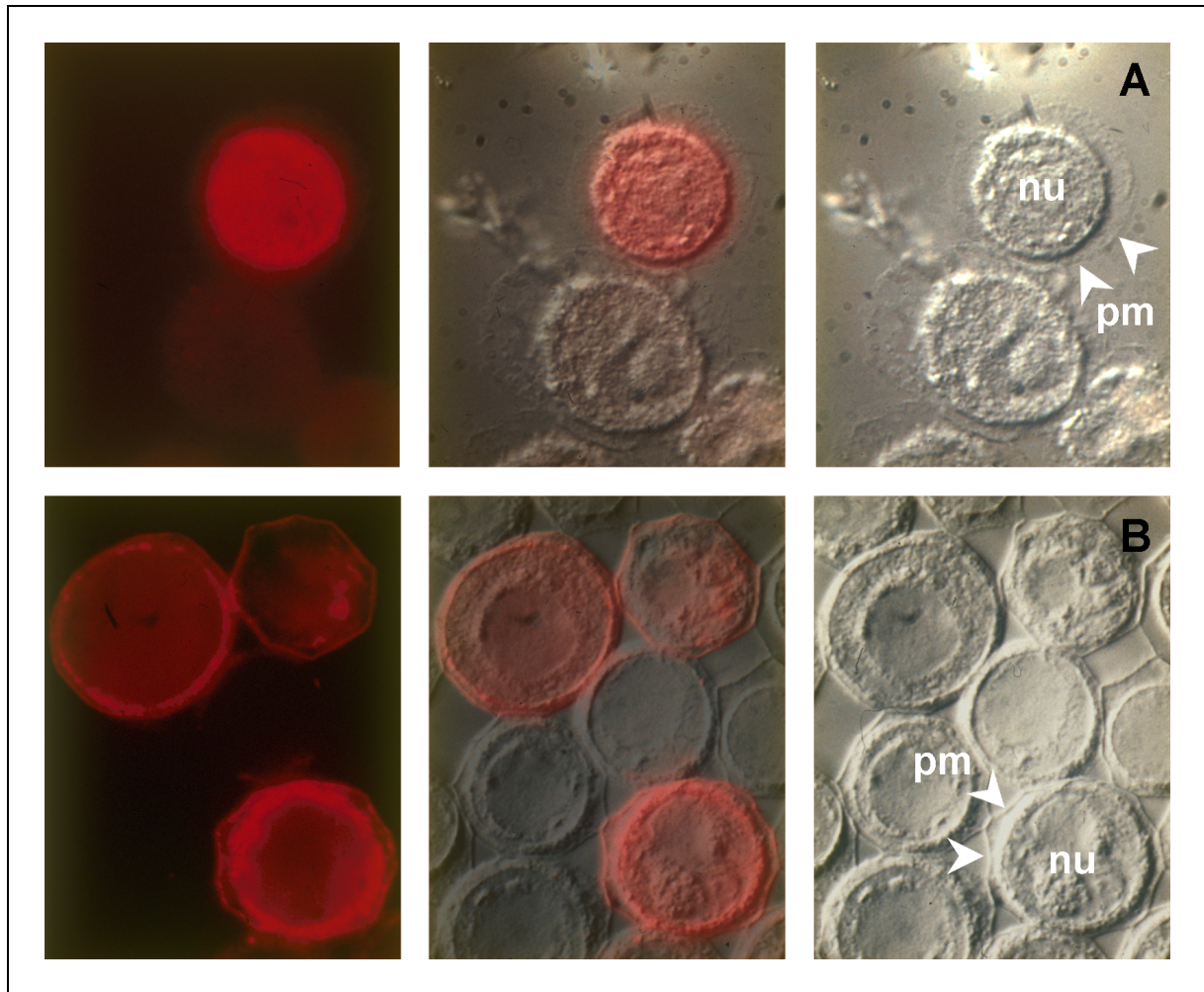


Abbildung 3.3. Immunfluoreszenzfärbung von AtKC1 (A) und AtPIN1 in Sf9 Zellen (B). Links: FITC-Fluoreszenz; rechts: differentielle Phasenkontrastoptik; mittig: Überlagerung beider Bilder. nu: Nukleus; die Pfeile deuten auf die Plasmamembran (pm). Als Erstantikörper wurden anti-AtKC1-Antikörper (1:200 Verdünnung), respektive anti-PIN1-Antikörper (1:200 Verdünnung) verwendet, Zweitantikörper anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an das FITC-Chromophor (1:500 Verdünnung).

Damit konnte gezeigt werden, daß der Hauptanteil des rekombinanten Proteins im ER lokalisiert ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß ein minimaler Anteil an der Plasmamembran lokalisiert, dort jedoch aus anderen Gründen keine Kaliumkanal-Funktionalität zeigt.

3.1.2.1.2 Expression von Signalpeptid-Fusionsproteinen und Deletionsmutanten

Der intrazelluläre Transport eines Proteins an interne Membranen oder die Plasmamembran kann durch Signalsequenzen im Aminoterminus bestimmt werden. Das Melittin-Präproprotein der Honigbiene (*Apis mellifica*) besitzt N-terminal eine solche 21

Aminosäuren umfassende Signalsequenz (Mollay *et al.*, 1982). Durch Fusion dieser Präpro-Sequenz an rekombinante Proteine konnte bei Expression in Sf9-Zellen eine gesteigerte Sekretion (Tessier *et al.*, 1991), bzw. eine erhöhte Plasmamembranlokalisierung (Gimpl *et al.*, 1995) gezeigt werden.

Diese Präpromelittin-Signalsequenz wurde N-terminal an *AtKC1* fusioniert (Vektorkarte: s. Anhang 6.1). Wurde dieses Konstrukt in Insektenzellen exprimiert, konnte durch immunocytochemische Methoden AtKC1 wiederum nur im ER detektiert werden (keine Abb., jedoch Abb. 3.3 vergleichbar).

Retentionssequenzen können auch carboxyterminal oder intern im Protein lokalisiert sein: Zum Beispiel konnten Zerangue *et al.* (1999) zeigen, daß ein ATP-abhängiger K⁺-Kanal (K_{ir} 6.2) erst an den Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SUR1) im ER binden muß, so daß ein Heterooctamer gebildet wird. Durch die Maskierung der internen und C-terminalen Retentionssequenzen wird dieser Komplex nicht mehr ins ER zurückgeführt. Nach Deletion dieser Sequenz wurde der K_{ir}6.2 K⁺-Kanal als Homomer ohne Bindung an SUR1 zur Plasmamembran transportiert (Tucker *et al.*, 1997).

Diesem experimentellen Ansatz vergleichbar wurden durch PCR carboxyterminale Deletionen von *AtKC1* erzeugt (Abb. 3.5). Die Deletionen wurden derart gewählt, daß vor zwei oder drei basischen Aminosäuren in Folge ein Stop-Codon eingeführt wurde (s. Abb. 3.4), so daß sich insgesamt 4 Deletionskonstrukte (Δ_c) ergaben, die am C-Terminus um 26, 33, 80 und 128 Aminosäuren respektive verkürzt waren.

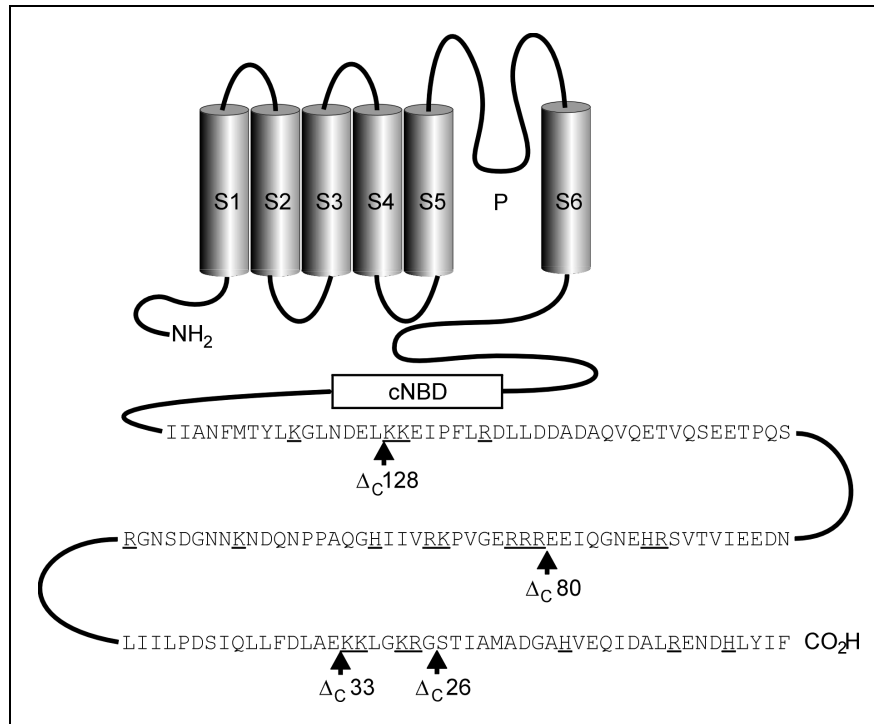


Abbildung 3.4. Schematische Darstellung der Deletionsmutanten. Die Pfeile markieren, bis zu welchen Positionen durch Deletionsmutagenese im Carboxyterminus das AtKC1-Protein verkürzt wurde. Positiv geladene Aminosäuren (Histidin (H), Lysin (K) und Arginin (R)) sind unterstrichen.

Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 3.5 gezeigt (Vektorkarte im Anhang 6.1).

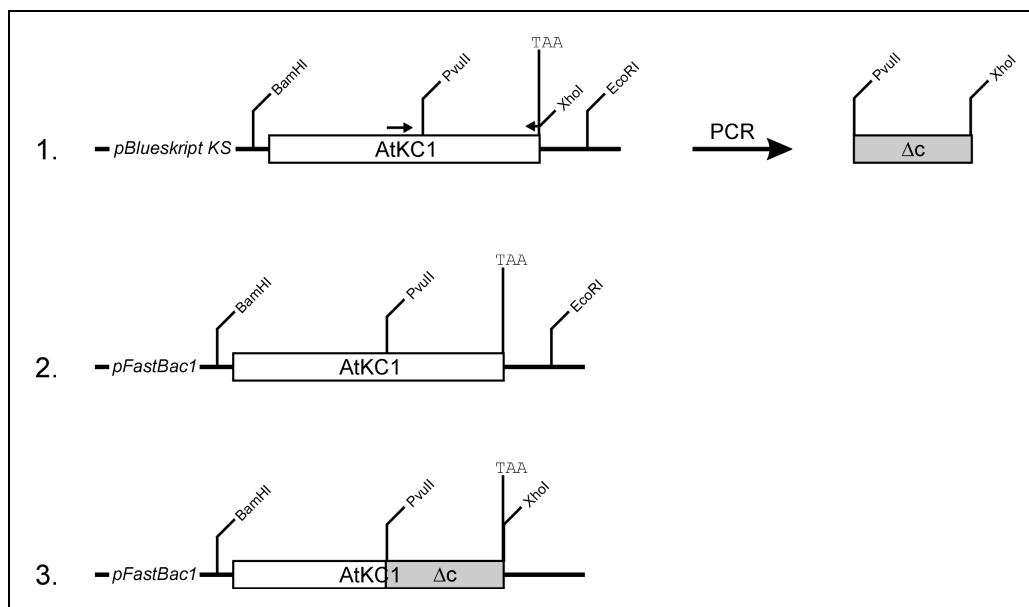


Abbildung 3.5. Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der AtKC1-Deletionsmutanten. (1) Durch PCR wurde ein Teil des 3'-Bereiches von AtKC1 deletiert (s. a. 2.2.5.7, "PCR zur Darstellung von Deletionsmutanten im 3'-Bereiches von AtKC1"). (3) Nach PvuII/XhoI-Verdau des PCR-Produktes wurde dieses in den PvuII/EcoRI-geschnittenen Vektor pFastBac AtKC1 ligiert.

Die Expression der AtKC1-Deletionskonstrukte wurde durch Westernblot-Analyse der infizierten Sf9-Ganzzelllysate kontrolliert. Die Deletionsproteine AtKC1 Δ_{c26} , Δ_{c33} und Δ_{c80} konnten detektiert werden und die apparenten Molekularmassen entsprachen den theoretisch vorhergesagten (s. Abb. 3.6). Die Detektion des AtKC1-Konstruktes Δ_{c128} war nicht möglich, da durch die vollständige Deletion des antigenen Bereiches kein AtKC1-spezifisches Epitop vom Antikörper erkannt werden konnte.

Nach Expression dieser Konstrukte in Insektenzellen konnten durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie die verkürzten AtKC1-Proteine Δ_{c26} , Δ_{c33} und Δ_{c80} mittels anti-AtKC1-Antikörpern wiederum nur im ER detektiert werden (keine Abb., jedoch vergleichbar Abb. 3.3).

Durch elektrophysiologische Analyse sollte versucht werden, AtKC1-Deletionsproteine funktionell an der Plasmamembran zu vermessen. Doch wiederum konnte nach Infektion von Sf9-Zellen bei keinem Konstrukt ein spannungsabhängiger K⁺-Strom gemessen werden (keine Abb., jedoch vergleichbar Abb. 3.2 A).

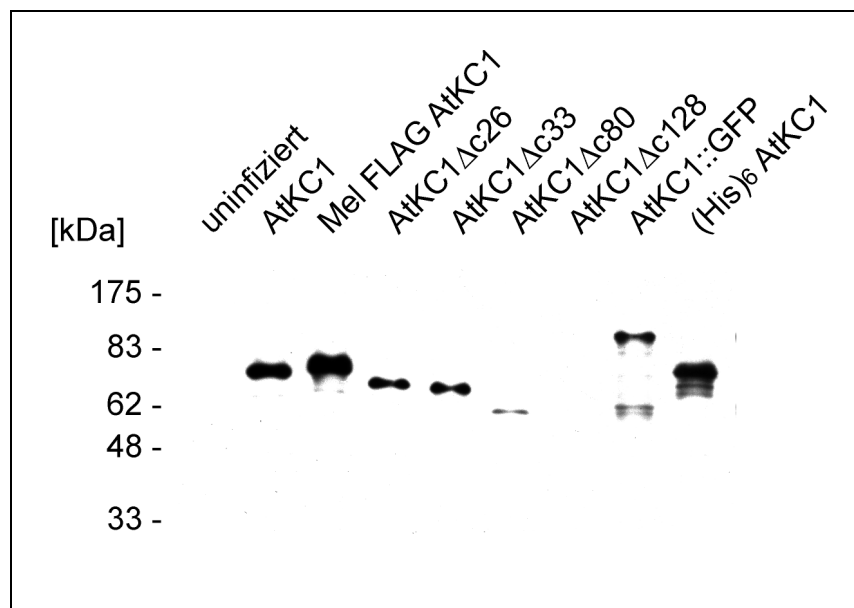


Abbildung 3.6. Westernblot-Analyse vom mit verschiedenen AtKC1-Konstrukten infizierten Sf9-Zellen. Die Zellen wurden 60 h p. i. isoliert und in PBS durch Sonifikation lysiert. 10 % Gel, reduzierende Bedingungen. Erstantikörper: anti-AtKC1-Antikörper, 1:5000 Verdünnung; Zweitantikörper: anti-Kaninchen-Antikörper, gekoppelt an Meerrettichperoxidase, 1:20000 Verdünnung.

Zum Vergleich von nativem AtKC1 und rekombinantem und N-terminal verkürztem AtKC1-Protein aus Sf9, wurden durch Westernblot-Analyse die apparenten molekularen Massen untersucht. Die Signale von nativem AtKC1 zeigen annähernd gleiche apparente

molekulare Masse verglichen mit rekombinantem AtKC1 aus Sf9-Zellen (s. Abb. 3.7). Demgegenüber erscheint das Signal des um 52 Aminosäuren N-terminal verkürzten AtKC1-Proteins aus infizierten Sf9-Zellen bei geringerer Molekularmasse. Daraus kann geschlossen werden, daß das native AtKC1-Protein kein proteolytisch abspaltbares Signalpeptid beinhaltet.

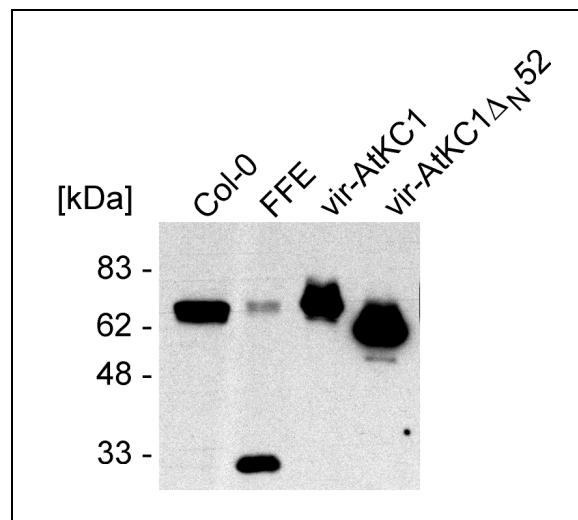


Abbildung 3.7. Westernblot-Analyse zur Untersuchung der apparenten molekularen Massen von nativem und rekombinanten AtKC1. Col-0: mikrosomale Fraktion aus Columbia Wildtyp-Pflanzen; FFE: Fraktion A der durch *Freeflow*-Elektrophorese isolierten Membranfraktionen; vir-AtKC1: Ganzzelllysate von Sf9 Zellen infiziert mit vir-AtKC1; vir-AtKC1 Δ N52: Ganzzelllysate von Sf9 Zellen infiziert mit rekombinanten Viren zur Expression von N-terminal verkürztem AtKC1. 10 % Gel, reduzierende Bedingungen. Erstantikörper: anti-AtKC1-Antikörper, 1:5000 Verdünnung; Zweitantikörper: anti-Kaninchen-Antikörper, gekoppelt an Meerrettichperoxidase, 1:20000 Verdünnung.

3.1.2.2 Expression in BY2-Tabaksuspensionszellen

Da durch die heterologe Expression in Sf9-Zellen AtKC1 nicht an der Plasmamembran lokalisiert werden konnte, sollte AtKC1 in einem pflanzlichen Modell exprimiert werden. Dazu wurden C-terminale Fusionen mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) hergestellt und in einen Vektor kloniert, der die transiente Expression in BY2-Tabaksuspensionszellen unter der Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors ermöglicht. Durch PCR wurde der 3'-Bereich der *AtKC1*-cDNA amplifiziert und das Stop-Codon TAA zu TCA mutiert; das Fusionskonstrukt von AtKC1 und GFP wurde in den Vektor pUC18 35S kloniert (s. Abb. 3.8, Vektorkarte im Anhang 6.1).

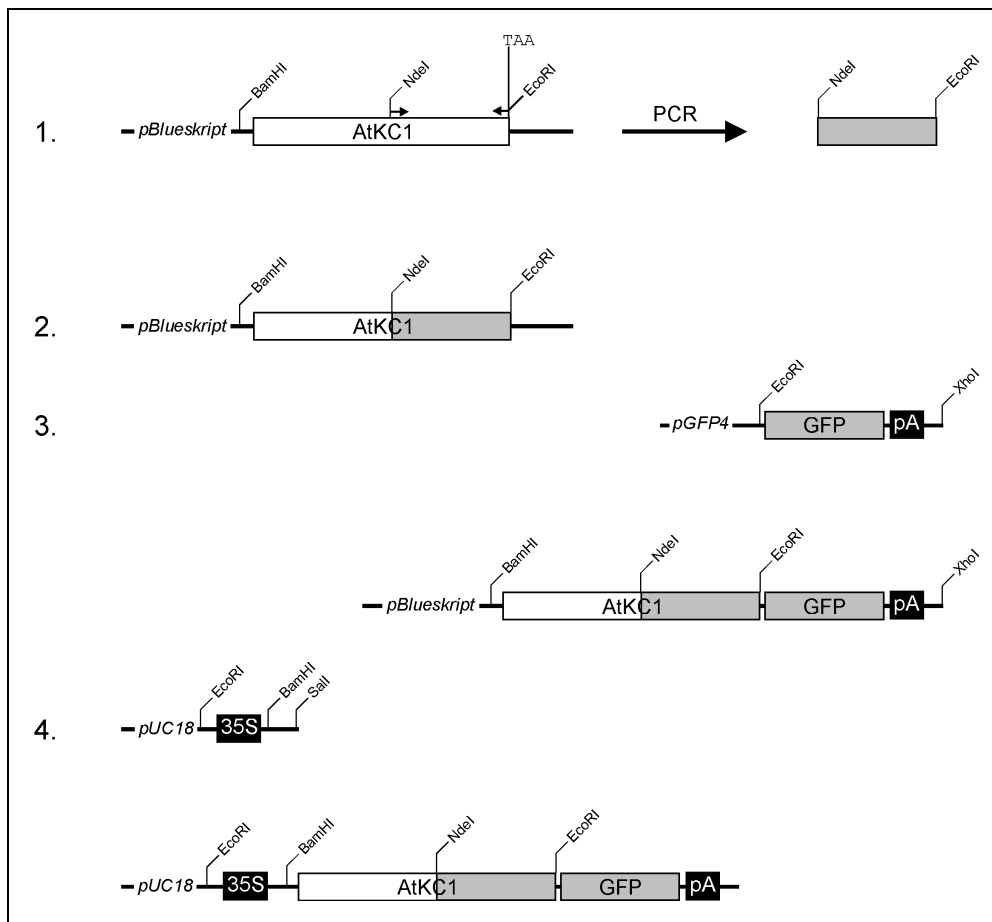


Abbildung 3.8. Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Generierung des Fusionskonstruktes von AtKC1 und GFP unter der transkriptionellen Kontrolle des 35S Promotors. (1.) Durch PCR wurde das Stopcodon TAA von *AtKC1* zu TCA mutiert (s. a. 2.2.5.7, “PCR zur Deletion des Stop-Codons in der *AtKC1*-cDNA”) und eine EcoRI-Schnittstelle eingeführt. (2.) Das PCR-Produkt wurde nach NdeI/EcoRI-Verdau in den gleichermaßen geschnittenen Vektor pBlueskript AtKC1 kloniert. (3.) Das GFP-Gen mit der Polyadenylierungs-Sequenz wurde aus dem Vektor pGFP4 durch EcoRI/XhoI-Verdau in den gleichermaßen geschnittenen Vektor pBlueskript AtKC1 (ohne Stopcodon) kloniert. (4.) Das Fusionskonstrukt AtKC1::GFP mit Polyadenylierungs-Signal wurde als BamHI/XhoI-Fragment in den gleichermaßen geschnittenen Vektor pUC18 35S kloniert. Die Vektorkarte von pUC 35S-AtKC1::GFP-pA findet sich im Anhang (6.1).

In der Überlagerung von Fluoreszenz- und differentieller Kontrast-Aufnahme konnte das Signal des AtKC1::GFP-Fusionsproteins nur im ER beobachtet werden (s. Abb. 3.9 A). Durch die Positivkontrolle, der Expression des zyklisch-Nukleotid-bindenden Transporters AtCNBT1, fusioniert an GFP, konnte das Fluoreszenzsignal einer Plasmamembran-Lokalisierung gezeigt werden (Abb. 3.9 B, P. Wolff, 1999).

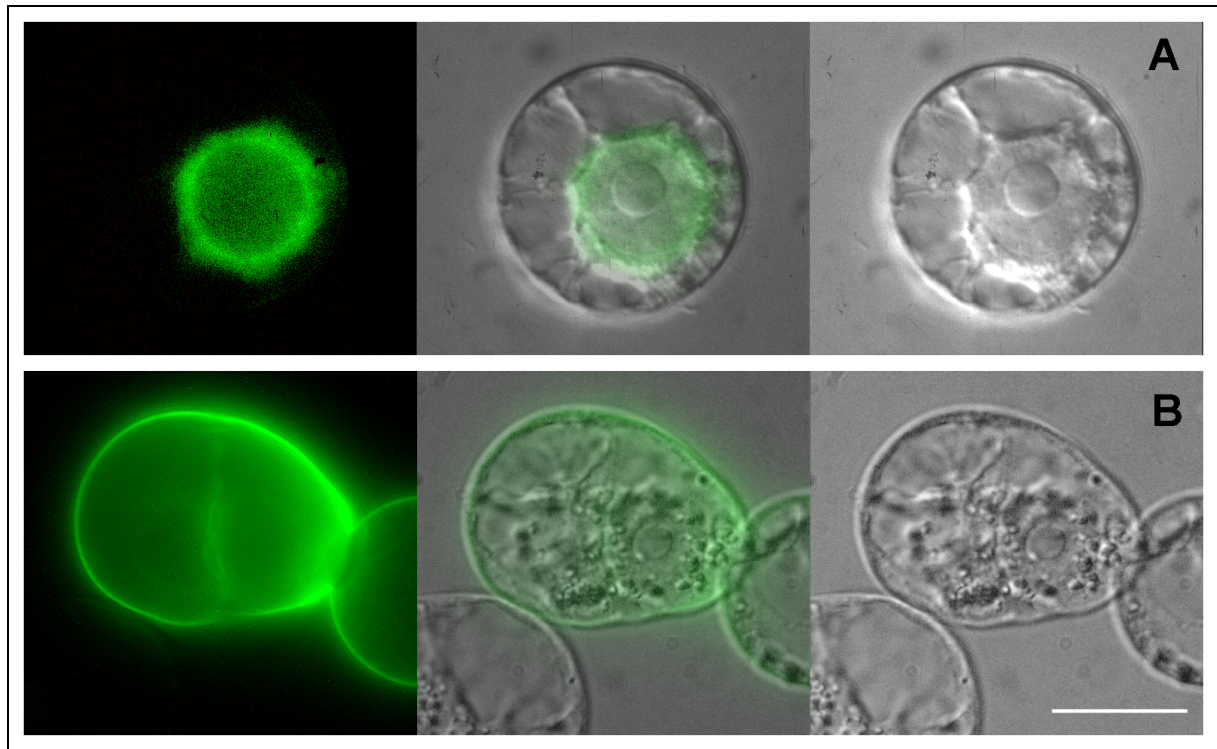


Abbildung 3.9. Lokalisierung von AtKC1 und AtCNBT1 in BY2-Tabaksuspensionszellen. Links: GFP-Fluoreszenz; rechts: differentielle Phasenkontrastaufnahmen; mittig: Überlagerung beider Bilder. (A) AtKC1::GFP Fusionsprotein (B) AtCNBT1::GFP Fusionsprotein. Der weiße Balken entspricht einer Größe von 20 µm.

3.1.3 Charakterisierung von AtKC1-*knockout*-Mutanten

Um die Funktion eines Proteins *in planta* studieren zu können, sind Pflanzenmutanten, in denen ein Gen funktionell inaktiviert ist, besonders hilfreich. Für die Analyse der AtKC1-Funktion sollte eine solche Insertionslinie identifiziert werden.

Am MPIZ in Köln wurden mehrere Populationen von *A. thaliana* erzeugt, die durch das *En-1*-Transposon mutagenisiert sind (Wisman *et al.*, 1998). Durch die Gesamtheit der *En-1*-Insertionen sollte theoretisch jedes Gen des Genoms ausgeschaltet werden können. Einzelne Pflanzen tragen dabei etwa 5 bis 20 Insertionen (K. Dekker, persönliche Mitteilungen) und eine unbestimmte Zahl von *footprints*, die nur gezielt im Genom der Pflanze detektiert werden können.

Die Insertion des *En-1*-Transposons in das Genom führt typischerweise zu einer 3-Basen Duplikation in der Insertionssequenz. Bei der Exzision bleibt ein sogenannter *footprint* zurück; verschiedene Fälle sind möglich: (1) Am häufigsten ist das Zurücklassen der duplizierten 3 Basen, was meist zu einer funktionellen Wiederherstellung des betroffenen

Gens führt. (2) Ist die Exzision unpräzise und es bleibt eine von 3n verschiedene Basenanzahl zurück, kann durch eine Verschiebung des offenen Leserasters ein dauerhafter *knockout* erzeugt werden. (3) Darüber hinaus können auch (seltener) Basen des Zielgens deletiert werden. Die Excision kann einzelne Zellen oder Zellverbände betreffen (somatische Reversion) oder aber durch Zellen der Keimbahn stabil an die nächste Generation weitergegeben werden (Keimbahnreversion), so daß in der Tochterpflanze alle Zellen betroffen sind.

3.1.3.1 Identifizierung einer *En-1*-Insertions-Mutante

In der *En-1*-Mutantenbank wurde eine Pflanze identifiziert, in welcher das *En-1*-Transposon in die Exon/Intron-Grenze am 3'-Ende des ersten Exons des *AtKC1*-Gens insertierte (hier *AtKC1*-258 genannt; Reintanz, 1997). Obwohl die Spleißstelle von AGGT zu AGCA mutiert wurde, konnte durch Northern-Blot Analyse eine Reduktion des Transkriptes um nur 30 % detektiert werden. Um die *AtKC1*-mRNA-Menge stärker bzw. ganz zu reduzieren, sollte eine neue Mutante generiert werden; dabei wurde von der Eigenschaft des *En-1*-Transposons Gebrauch gemacht, bevorzugt in benachbarte Regionen des Genoms zu springen.

Von homo- und heterozygoten *AtKC1*-258-Linien wurden Pflanzen im Gewächshaus angezogen. Die Pflanzen wurden in 16 Gruppen mit je 108 Pflanzen eingeteilt, von denen genomische DNA zur PCR-Analyse (siehe 2.2.1.4) präpariert wurde. Mit diesen DNA-Präparationen wurden PCR-Analysen mit zwei Primerkombinationen durchgeführt: Der *AtKC1*-spezifische Primer At-3 (Position 520 bp des Gens) wurde mit je einem 3'- und einem 5'-Primer des *En-1*-Transposons (Position 205 und 8130) kombiniert (s. Abb. 3.11). Die PCR-Ansätze wurden nach Immobilisierung auf einer Membran mit einer *AtKC1*-Sonde hybridisiert. Primer und Sonde wurden derart gewählt, daß ein Signal nur dann detektiert wurde, wenn das Transposon 3'-wärts der ursprünglichen Insertionsstelle (*En*-258) neu insertierte (s. Abb. 3.10).

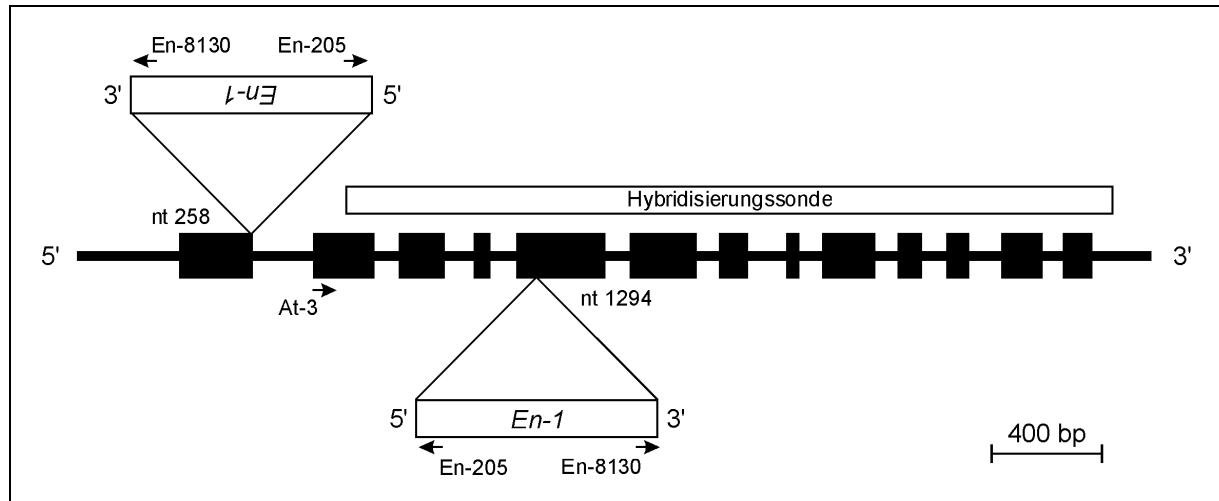


Abbildung 3.10. Schematische Darstellung der Identifizierung einer neuen *AtKC1::En-1* Insertionsmutante. Die Exons sind als schwarze Kästchen, die Introns als Striche dargestellt. Die zur Hybridisierung verwendete Sonde ist oberhalb des Gens dargestellt. Die Positionen der verwendeten Primer sind durch Pfeile markiert. Die Positionen der insertierten Transposons sind oberhalb (En-258-Insertion) und unterhalb (En-1294-Insertion) des Gens angegeben.

In einer PCR-Reaktion auf zusammengefasster genomischer DNA einer Pflanzengruppe (Pool 7) wurde ein *AtKC1* spezifisches Signal von 1,5 kb Größe detektiert (Primer-Kombination At-3 und En-205, s. Abb. 3.11).

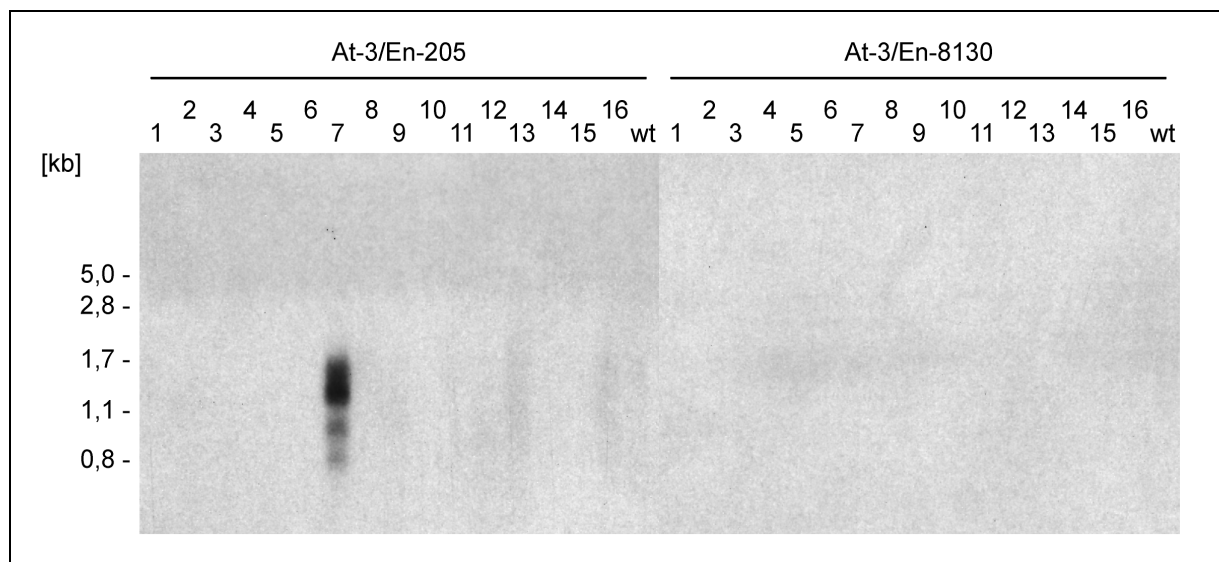


Abbildung 3.11. Autoradiogramm der PCR-Blot-Analyse. Nach PCR mit zwei Primer-Kombinationen (At-3/En-205 und At-3/En-8130) auf der genomischen DNA der 16 Gruppen mit je 108 Pflanzen wurden die PCR-Produkte immobilisiert und mit einer *AtKC1*-spezifischen Sonde hybridisiert. Gezeigt ist das Autoradiogramm nach einer Expositionszeit von 2 h. Auf der linken Seite ist der DNA-Größenstandard in kb angegeben. Oberhalb des Autoradiogramms sind die Nummern der Pflanzengruppe (wt: Columbia Wildtyp-Pflanzen) und die verwendeten Primer-Kombinationen angegeben.

Um die neue Mutante zu isolieren, wurden von allen 108 Pflanzen dieser Gruppe (Pool 7) separat genomische DNA präpariert und durch PCR-Analyse mit der gleichen Primer-Kombination analysiert. Die *En-I*-Insertion konnte in einer Pflanze (Nr. 60) nachgewiesen werden. Durch Sequenzierung der PCR-Produkte wurde die *En-I*-Insertion an Position nt 1294 - 1296 (En-1294-Insertion), im 5. Exon lokalisiert (s. Abb. 3.10). In der Ausgangsmutante AtKC1-258 ist das Transposon in 3'-5'-Richtung bezüglich des *AtKCI* inseriert (En-258-Insertion). In der neuen Mutante AtKC1-1294 liegt das *En-I*-Transposon in 5'-3'-Richtung vor und ist um 1037 bp in 3'-Richtung verschoben.

3.1.3.2 Southernblot-Analyse

Zur Vereinfachung einer nachfolgenden Segregationsanalyse sollten in einem Vorexperiment vor allem die Pflanzen identifiziert werden, die die En-258-Insertion verloren hatten und nur noch die En-1294-Insertion enthielten. Es wurden 34 Nachkommen der Pflanze Nr. 60 durch PCR analysiert: 13 Pflanzen (38 %) wiesen die neue En-1294-Insertion auf, 17 Pflanzen die ursprüngliche En-258-Insertion (50 %).

Aufgrund der somatischen Reversion des Transposons kann durch PCR-Analysen nicht unterschieden werden, ob eine Pflanze homo- oder heterozygot für eine bestimmte *En-I*-Insertion ist. Zur Identifikation der entsprechenden Pflanzen wurde eine Southernblot-Analyse durchgeführt.

Durch die Wahl von EcoRI zur Restriktionsspaltung der genomischen DNA und einer 3'-terminalen AtKC1-Sonde (s. Abb. 3.12) konnten die beiden *En-I*-Insertionen (nt 258, bzw. nt 1294) durch die unterschiedlichen Größen der hybridisierenden EcoRI-Fragmente identifiziert werden.

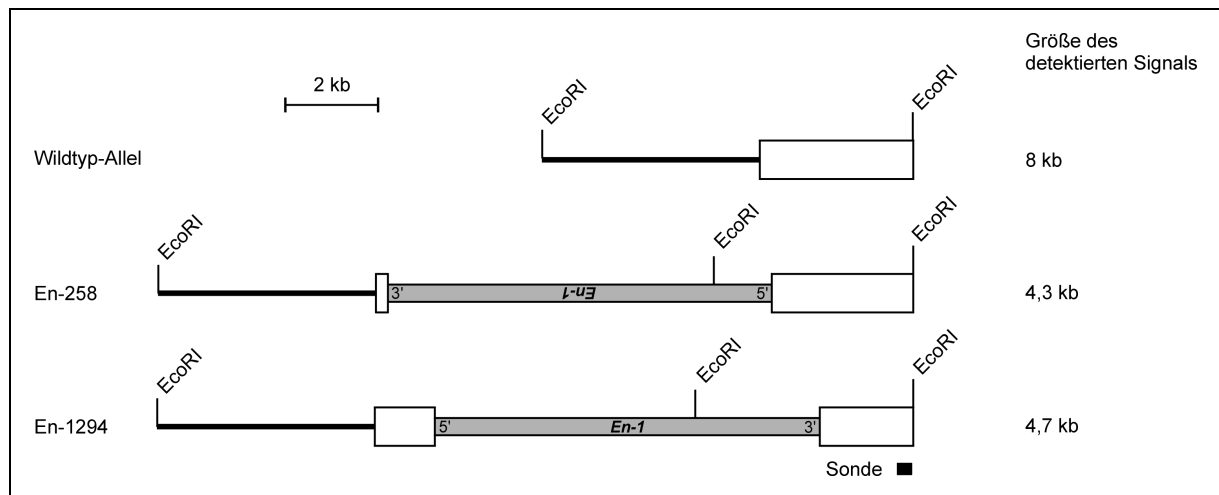


Abbildung 3.12. Schematische Darstellung der Southernblot-Analyse zur Identifikation der homo- und heterozygoten *AtKCI::En-1* Insertionsmutantenlinien AtKCI-1294. Das *AtKCI*-Gen ist als weißer Kasten dargestellt, das *En-1*-Transposon als grauer Kasten. Die relevanten EcoRI-Schnittstellen sind angezeigt.

Die Hybridisierungssignale zeigten für das Wildtyp-Allel eine Größe von 8 kb, für die En-258-Insertion eine Größe von 4,3 kb und für die En-1294-Insertion eine Größe von 4,7 kb (s. Abb. 3.13). Damit konnte bestimmt werden, daß die Pflanze 60.40 homozygot für die En-1294-Insertion ist und die Pflanze 60.30 homozygot für das Wildtyp-Allel sein sollte. Die Möglichkeit, daß in Linie 60.40 neben der En-1294-Insertion zusätzlich noch die ursprüngliche En-258-Insertion vorhanden ist, kann anhand der Southernblot-Analyse nicht ausgeschlossen werden, da beide *En-1*-Insertionen auf einem Allel nur das Hybridisierungssignal der En-1294-Insertion zeigen. Jedoch kann durch die Korrelation mit der PCR-Analyse die Anwesenheit der En-258-Insertion ausgeschlossen werden.

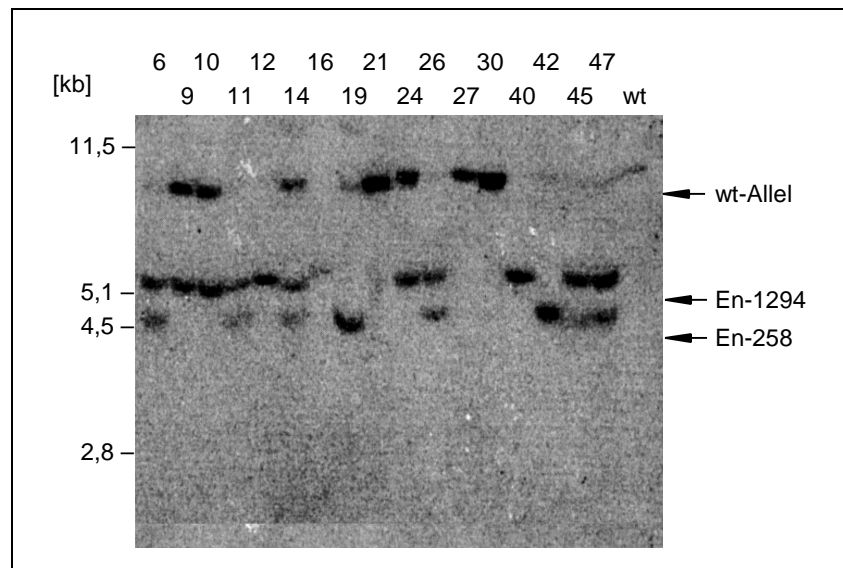


Abbildung 3.13. Autoradiogramm der Southernblot-Analyse. Das *AtKCI*-Wildtyp-Allel hybridisiert bei einer Größe von 8 kb (wt-Allel), das *AtKCI*-Allel mit der neuen Transposon-Insertion (En-1294) bei einer Größe von 4,7 kb und das *AtKCI*-Allel mit der ursprünglichen *En-1* Insertion (En-258) bei einer Größe von 4,3 kb. Der Größenstandard ist auf der linken Seite des Autoradiogramms angegeben. Oberhalb des Autoradiogramms sind die Nummern der F₁-Einzelpflanzen (60.6 bis 60.47; wt für Columbia Wildtyp-Pflanzen) angegeben.

Von 17 getesteten Pflanzen waren 3 homozygot und 3 heterozygot für die En-1294-Insertion; 2 waren heterozygot für die En-258-Insertion und 3 Linien zeigten das Signal für das Wildtyp-Allel. 6 Pflanzenlinien zeigten Signale für die En-295- und En-1294-Insertion.

Für die weiteren Analysen sollten vor allem Nachkommen der Linien 60.40 (im Folgenden *AtKC1*-1294 genannt; homozygot für die En-1294-Insertion) und der Linie 60.30 herangezogen werden; Pflanzen der Linie 60.30 sollten nach der Southernblot-Analyse homozygot für das Wildtyp-Allel von *AtKCI* sein und wegen der *En-1*-Insertionen und *footprints* in anderen genetischen Loci als Kontrolllinien dienen, um einen möglichen Verlust-Phänotyp zu charakterisieren.

3.1.3.3 RT-PCR-Analyse

In Northernblot Analysen konnte die *AtKCI*-mRNA nur in geringsten Mengen nachgewiesen werden (Reintanz, 1997), so daß eine qualitative Aussage nur schwer möglich war. Daher sollte durch RT-PCR untersucht werden, ob die *AtKCI*-mRNA-Menge in den Linien 60.9 (heterozygot für die En-1294-Insertion), 60.30 (nach den Ergebnissen Southernblot-Analyse homozygot für das Wildtyp-Allel, s. Abb. 3.13) und 60.40 (homozygot für die En-1294-Insertion) verändert war. Die Primer wurden derart gewählt, daß mehrere

Introns eingeschlossen wurden (*Actin II*: 3 Introns, nt 130 bis nt 1282 der cDNA; *AtKCI*: 4 Introns, nt 36 bis nt 917 der cDNA)

Im Vergleich zum Columbia-Wildtyp zeigten die Pflanzen der Linie 60.40 eine stark verminderte Menge an *AtKCI*-Transkript, während die Linie 60.9 einen Wildtyp-Transkriptspiegel aufwies. Pflanzen der Linie 60.30 transkribierten zwar weiterhin eine etwa gleichbleibende Menge an *AtKCI*-mRNA, jedoch von geringerer Größe (s. Abb. 3.14).

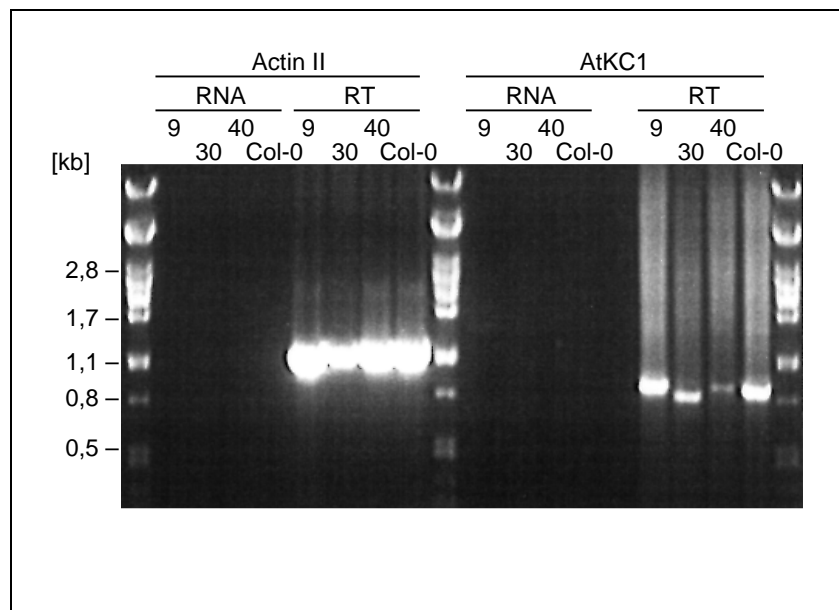


Abbildung 3.14. Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR. Gezeigt sind auf der linken Seite Actin II (An *et al.*, 1997) und auf der rechten Seite *AtKCI*. Als Kontrolle ("RNA" bezeichnete Spuren) wurde unbehandelte poly (A⁺) RNA in der PCR verwendet, um Kontaminationen durch genomische DNA nachzuweisen. "RT" bezeichnet die Spuren, in denen mit Reverser Transkriptase behandelte RNA als Template verwendet wurde; hierbei sollten PCR-Produkte, die durch genomische-DNA-Kontaminationen hervorgerufen wurden, zu einer größeren relativen molekularen Masse führen: *Actin II*: genomische DNA 1.8 kb, cDNA 1.2 kb; *AtKCI*: genomische DNA 1.4 kb, cDNA 0.9 kb. Die Spuren 9, 30, 40 und Col-0 bezeichnen die Quelle der isolierten RNA: Pflanzen der Linien 60.9 (heterozygot für die En-1294-Insertion), 60.30 (homozygot für den *footprint*), 60.40 (homozygot für die En-1294-Insertion) und Columbia Wildtyp.

3.1.3.4 Identifizierung einer *footprint*-Mutante

Um die Identität der amplifizierten mRNA zu bestätigen und die Ursache für die Verkürzung der mRNA der Linie 60.30 aufzuklären, wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert und sequenziert. Darüber hinaus wurde der Bereich der zweiten En-Insertionsstelle (En-1294) im *AtKCI*-Gen der Linie 60.30 ebenfalls durch PCR amplifiziert und sequenziert.

Während im Bereich der En-1294-Insertionsstelle keine Änderung detektiert werden konnte, zeigte die ursprüngliche En-258-Insertionsstelle einen *footprint*, der durch Exzision des *En-1* aus dem *AtKCI*-Gen hervorgerufen wurde. 3'-wärts der ursprünglichen En-258-Insertionsstelle wurden 70 bp deletiert und 8 bp neu insertiert. Dadurch ergab sich ein Stop-Codon (TAA) im Leseraster nach dem für Ala₆₂ codierenden Triplet und eine PstI-Schnittstelle (s. Abb. 3.15). Es sollte also durch die vorzeitige Terminierung des Translation kein funktioneller K⁺-Kanal mehr gebildet werden. Die Mutantenlinie 60.30 wird im folgenden als *Atkc1-f*-Mutante bezeichnet, für *AtKCI-footprint*.

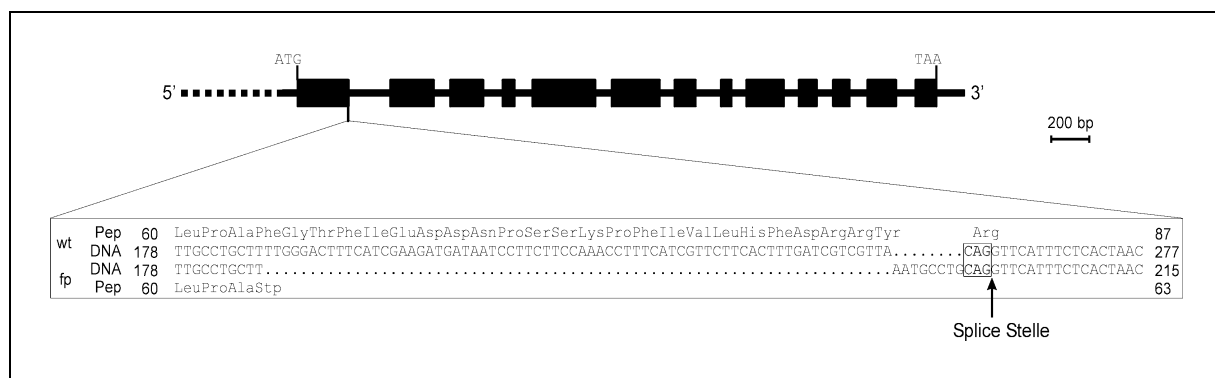


Abbildung 3.15. Schematische Darstellung des *footprint* der *Atkc1-f*-Mutante. Dargestellt ist das *AtKCI*-Gen mit Exons (schwarze Kästchen) und Introns (Linien). Unterhalb ist ein detaillierter Ausschnitt der Nukleotid- (DNA) und Aminosäuresequenz (Pep) des Wildtyp-Allels (wt) von *AtKCI* und der *footprint*-Mutation (fp) angegeben. Die Zahlen bezeichnen die Aminosäure- und Nukleotidpositionen bezüglich des Start-ATG. Punkte (.) symbolisieren fehlende Nukleotide zur Maximierung der Überlappung beider Sequenzen.

Die PCR auf der genomischen DNA zeigte auf zwei analysierten Nachkommenlinien der *Atkc1-f*-Mutante 60.30 (Pflanzenlinien 60.30.1 und 60.30.4) nur ein Produkt von 429 bp Größe (dazu s. a. 3.1.5 und Abb. 3.21) und die Sequenz-Analyse des isolierten PCR-Produktes lieferte eindeutige Signale. Darüber hinaus konnte durch PCR gezeigt werden, daß 7 F₁-Pflanzen aus einer Kreuzung von Linie 60.30 mit Columbia-Wildtyp alle heterozygot bezüglich des *footprints* waren. Aus all dem kann geschlossen werden, daß die *Atkc1-f*-Mutantenlinie 60.30 bezüglich des *footprints* homozygot war.

3.1.3.5 Westernblot Analyse

Da die Sequenzdaten der *Atkc1-f*-Mutante für ein möglicherweise auf die ersten 62 Aminosäuren verkürztes und damit nicht mehr funktionelles *AtKCI*-Protein sprechen,

wurden mikrosomale Proteine aus Wurzeln isoliert, um die AtKC1-Proteinmenge zu bestimmen. Darüber hinaus sollte der AtKC1-Proteinspiegel in der Mutantenlinie AtKC1-1294 bestimmt werden, da aufgrund somatischer Reversion eine Restmenge an AtKC1 erwartet werden konnte.

Für die Westernblot-Analyse wurde ein polyklonaler Erstantikörper verwendet, der gegen den hydrophilen C-Terminus, genauer Aminosäureposition 528 bis 661, des AtKC1 gerichtet ist (s. 2.2.12.1).

In der Westernblot-Analyse konnte in mikrosomalen Proteinen aus Columbia Wildtyp-Pflanzen ein AtKC1-spezifisches Signal bei einer apparenten Molekularmasse von etwa 76 kDa detektiert werden. Dies ist in guter Übereinstimmung mit einer durch cDNA-Analyse abgeleiteten Molekularmasse von 75,6 kDa. Im Vergleich zum Columbia-Wildtyp konnte weder in der Linie AtKC1-1294 noch in der Linie *Atkc1-f* ein AtKC1-spezifisches Signal detektiert werden (s. Abb 3.16). Allein unter verlängerten Expositionszeiten von etwa 2 h konnte in der Linie AtKC1-1294 ein schwaches, AtKC1-spezifisches Signal detektiert werden (nicht gezeigt).

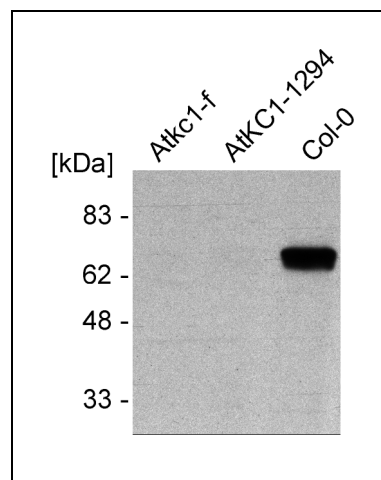


Abbildung 3.16. Westernblot-Analyse mikrosomaler Proteine von verschiedenen Pflanzenlinien. Die Spuren zeigen Proteinpräparationen der homozygoten *Atkc1-f*-Mutante, der homozygoten Insertionslinie AtKC1-1294 und von Columbia Wildtyppflanzen (Columbia wt). 10 % Gel, reduzierende Bedingungen. Erstantikörper: anti-AtKC1-Antikörper, 1:5000 Verdünnung; Zweitantikörper: anti-Kaninchen-Antikörper, gekoppelt an Meerrettichperoxidase, 1:20000 Verdünnung.

Damit konnte gezeigt werden, daß in der Mutantenlinie *Atkc1-f* kein funktionelles AtKC1-Protein exprimiert wird, in der Mutantenlinie AtKC1-1294 nur noch geringe Mengen.

3.1.4 Elektrophysiologische Untersuchungen

Das Ausschalten einer K^+ -Kanal- α -Untereinheit führte in den bisher veröffentlichten Mutantenlinien (s. a. Anhang 6.2), betrachtet man die gesamte Pflanze, nicht zu stark ausgeprägten phänotypischen Abweichungen vom Wildtyp. Andererseits kann erwartet werden, daß das elektrophysiologische Verhalten des K^+ -Kanalensembles einzelner, isolierter Zellen charakteristische Änderungen im spannungsabhängigen Schaltverhalten, Kinetik, Selektivität oder pharmakologischer Inhibierung zeigt.

Nach Untersuchung der *AtKCI*-Promotor-GUS-transformierten Pflanzen konnte eine verstärkte Promotoraktivität in Endodermis und Wurzelhaaren gezeigt werden (Reintanz, 1997). Daher sollten zur Untersuchung elektrophysiologischer Charakteristika Wurzelhaarprotoplasten von Mutanten- und Wildtyp-Linien isoliert und analysiert werden.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hedrich in Würzburg wurde ein Protokoll entwickelt, welches durch zeitlich begrenzten Zellulase- und Pektolyase-Verdau vor allem Wurzelhaarprotoplasten freisetzt (Ivashikina *et al.*, 2001).

Protoplasten von Wildtyp- und *Atkc1-f*-Pflanzen zeigten unter hyperpolarisierenden Bedingungen typische einwärtsgerichtete K^+ -Ströme. In den Protoplasten der *Atkc1-f* Pflanzen konnte jedoch eine schnellere Aktivierungskinetik festgestellt werden, d. h. die K^+ -Kanäle erreichten unter hyperpolarisierenden Potentialen schneller den maximalen Strom (s. Abb. 3.17).

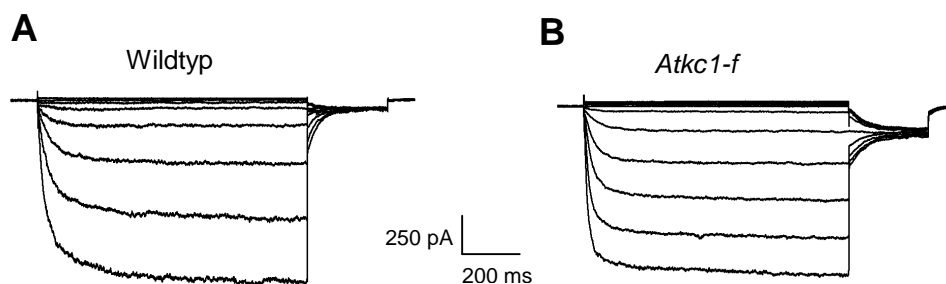


Abbildung 3.17. Patch clamp-Analyse von Wildtyp- (A) und *Atkc1-f*-Protoplasten (B) in der Ganzzell-Ableitung. Ausgehend von einem Haltepotential von -48 mV wurden von 52 mV bis -188 mV in 20 mV-Inkrementen Spannungspulse von 1 s Dauer angelegt. Dargestellt sind typische Stromspuren von Wurzelhaarprotoplasten.

K^+ -Kanäle können durch den pH-Wert reguliert werden, wobei ein saurer pH-Wert entweder aktivierend wirkt (KAT1 und KST1, Hoth und Hedrich, 1999) oder reprimierend (AKT2/3, Marten *et al.*, 1999) (s. a. 1.3.1 (2)). In Kontrollprotoplasten konnte gezeigt werden, daß eine extrazelluläre Alkalisierung von pH 5,6 zu pH 7,0 zu einer Verminderung des K^+ _{in}-Stroms im Mittel um 26 % führt (s. Abb. 3.18 A). Dieser Effekt wird in Atkc1-f Wurzelhaarprotoplasten umgekehrt: Die Verringerung der Protonenkonzentration erhöht den K^+ _{in}-Strom im Mittel um 15 % (s. Abb. 3.18 B).

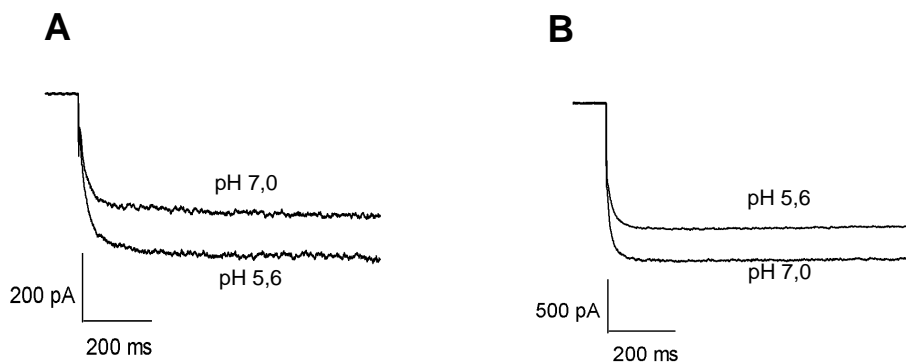


Abbildung 3.18. Effekt des externen pH-Wertes auf den K^+ _{in}-Strom in Wildtyp- und Atkc1-f-Protoplasten. Dargestellt sind typische Stromspuren der Ganzzell-Ableitungen von Wildtyp-Protoplasten (A) und Atkc1-f-Protoplasten (B) bei einem Transmembranpotential von -188 mV und extrazellulären pH-Werten von 7,0, bzw. 5,6.

Da in einzelnen Pflanzenzellen wahrscheinlich mehrere K^+ -Kanal- α -Untereinheiten am Kaliumtransport über die Plasmamembran beteiligt sind, wurde der Einfluß verschiedener Ionen wie Cs^+ , Ba^{2+} und Rb^+ auf das Kanalverhalten untersucht: Aus dem Vergleich der Eigenschaften von heterolog exprimierten, genau definierten K^+ -Kanälen mit den nativen K^+ -Kanälen in Protoplasten kann versucht werden, Aussagen über die Beteiligung von einzelnen Kaliumkanal- α -Untereinheiten zu machen. Durch die Verwendung von AtKC1-Nullmutanten wurde dem nativen Kanalensemble von Wurzelhaarprotoplasten eine α -Untereinheit entzogen, so daß der regulatorische Einfluß von AtKC1 auf den Kaliumtransport untersucht werden konnte.

Für einige K^+ -Kanäle, wie z. B. KAT1, KST1 und AKT1 ist in heterologen Expressionssystemen eine Blockierung durch Cs^+ und Ba^{2+} bekannt (Schachtmann *et al.*, 1992; Bertl *et al.*, 1997; Brüggemann *et al.*, 1999). Protoplasten von Atkc1-f-Pflanzen

zeigten keine Änderung im Verhalten gegenüber Cs^+ und Ba^{2+} im Vergleich zu Kontrollprotoplasten, aber eine erhöhte Sensitivität gegenüber Rb^+ : Während Wildtyp-Protoplasten erst bei einer Konzentration von 30 mM Rb^+ nahezu komplett unterdrückt werden, geschieht dies bei Atkc1-f-Protoplasten bereits bei einer Konzentration von 1 mM (s. Abb. 3.19).

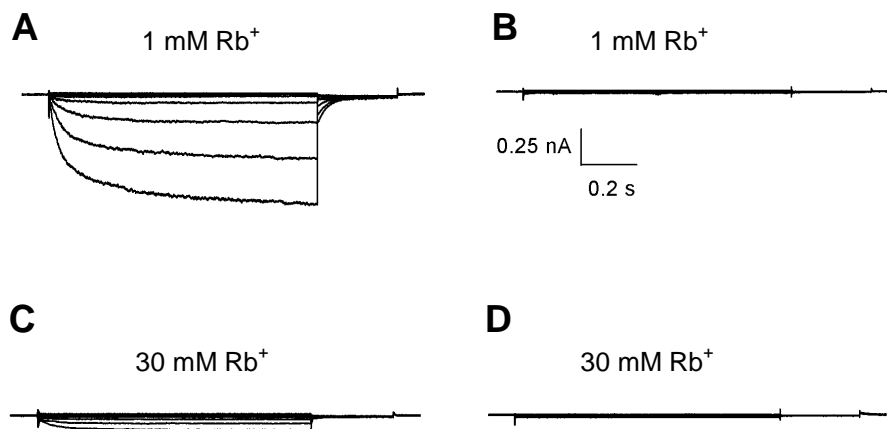


Abbildung 3.19. Effekt der externen Rubidium-Konzentration auf den Ioneneinstrom von Wildtyp- und Atkc1-f-Protoplasten. Dargestellt sind typische Stromspuren der Ganzzell-Ableitungen von Wildtyp-Protoplasten (A, C) und Atkc1-f-Protoplasten (B, D) bei extrazellulären $[\text{Rb}^+]$ von 1 mM (A, B) und 30 mM (C, D).

Bisher konnte in heterologen Expressionssystemen (*X. laevis* Oozyten) allein bei der K^+ -Kanal-Untereinheit AKT2/3 eine spannungsabhängige Blockierung des K^+ -Einstroms durch Ca^{2+} gezeigt werden (Marten *et al.*, 1999); andere untersuchte K^+ -Kanäle wie KAT1 (Brüggemann *et al.*, 1999) und AKT1 (R. Hedrich, persönliche Mitteilung) zeigen dieses Verhalten nicht. Demgegenüber konnte an isolierten Schließzellen-Protoplasten aus *V. faba* eine spannungsabhängige Blockierung des K^+ -Einstroms durch Ca^{2+} gezeigt werden (Dietrich *et al.*, 1998). Bei $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}} = 20$ mM konnte im Gegensatz zu Wildtyp-Protoplasten in Atkc1-f-Wurzelhaar-Protoplasten eine spannungsabhängige Blockierung des KaliumEinstroms gezeigt werden: Bis zu einem Membranpotential von etwa -130 mV zeigen die Kaliumkanäle keine Inhibierung. Bei negativeren Spannungen nimmt die Blockierung stetig zu. Unter verminderten Calciumkonzentrationen von 1 mM zeigten sich keine Unterschiede.

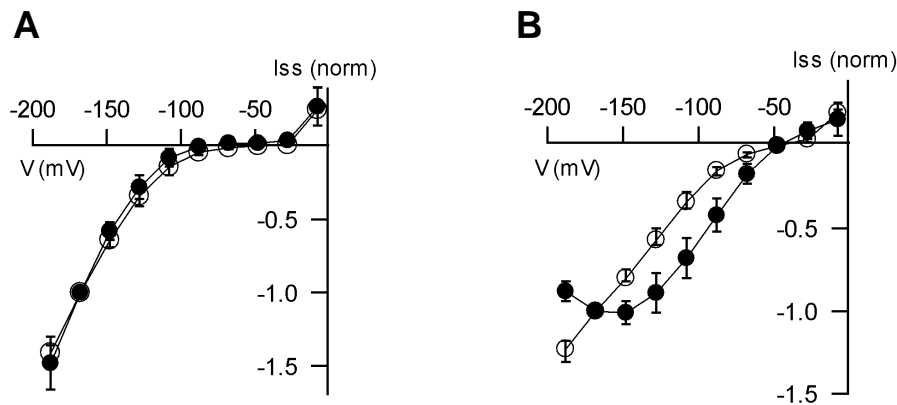


Abbildung 3.20. Effekt der externen Calcium-Konzentration auf den K⁺-Einstrom von Wildtyp- und Atkc1-f-Protoplasten. Gezeigt sind die I/U-Diagramme von Wildtyp- (A) und Atkc1-f-Protoplasten (B). Der *steady state*-Strom I (I_{ss}) wurde genormt auf die Stromstärke bei einem Membranpotential von -170 mV. Die Protoplasten wurden bei einer extrazellulären [Ca²⁺] von 1 mM (°) und 20 mM (●) vermessen.

3.1.5 Phänotyp-Analyse der Atkc1-f-Pflanzenlinie

Die Transposon-mutagenisierten Linien tragen durchschnittlich 5 bis 20 *En-1*-Insertionen; darüber hinaus befindet sich eine nicht ermittelte Anzahl von *footprints* im Genom, von denen einige möglicherweise ebenfalls einen Verlust-Phänotyp erzeugen können, der aber nicht in Verbindung zum AtKC1-*knockout* steht.

Da alle *En-1*-Insertionen und *footprints* phänotypische Veränderungen erzeugen können und um dennoch eine Korrelation zwischen AtKC1-*knockout* und einem möglichen Verlustphänotyp zu ermöglichen, wurde eine Population generiert, in welcher alle Transposons und *footprints* segregierten. Durch Analyse der Schwesterlinien untersucht werden, da ein Verlustphänotyp nur in den Pflanzen zu beobachten sein sollte, die homozygot für das AtKC1-f-Allel sind.

Die Atkc1-f-Ausgangslinie 60.30, bezüglich des *footprints* homozygot, wurde gegen Columbia Wildtyp gekreuzt und aus der F₁-Population durch Selbstung die segregierende F₂-Population erzeugt.

Einzelpflanzen wurden als hetero- oder homozygot bezüglich des AtKC1-f-Allels durch PCR (vgl. 2.2.5.7, "PCR zur Identifizierung der Homo- oder Heterozygotie der Atkc1-f-Mutanten") und nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Größenvergleich der PCR-Produkte bestimmt (s. Abb. 3.21). Das PCR-Produkt des Wildtyp-Allels ist 491 bp groß, das des *footprint*-Allels 429 bp. Bei PCR-Analysen auf genomischer DNA von heterozygoten

Pflanzen trat bei einer apparenten Größe von etwa 520 bp eine zusätzliche Bande auf; sie kam durch Sekundärstrukturen infolge der Hybridisierung von Einzelsträngen der PCR-Produkte der beiden unterschiedlichen Allele zustande.

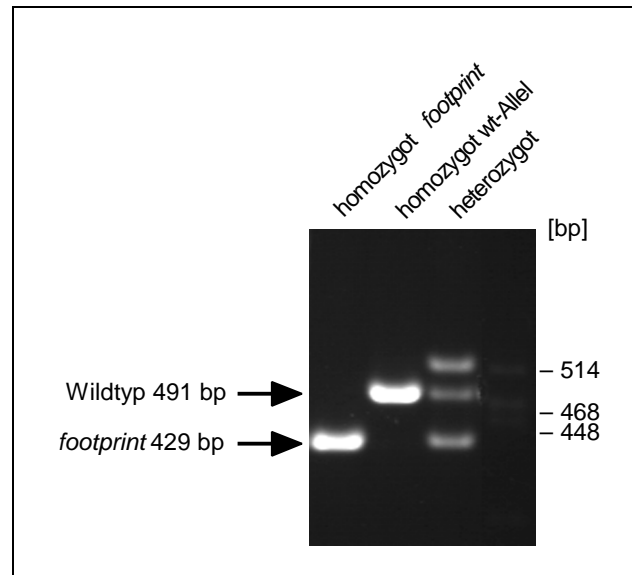


Abbildung 3.21. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Identifizierung homo- und heterozygoter Pflanzen. Gezeigt sind Spuren (von links nach rechts) einer homozygoten *Atkc1-f*-Mutante, einer Pflanze, die homozygot für das *AtKC1*-Wildtyp-Allel war, und einer heterozygoten Pflanzenlinie. Auf der rechten Seite ist der molekulare Größenstandard angegeben.

Die segregierende F_2 -Population der Kreuzung $wt \times 60.30$ zeigten teilweise starke Unterschiede im Wachstum und im Habitus, die jedoch nicht mit einem *AtKC1-knockout* korrelierten, weder unter Langtag- noch Kurztag-Bedingungen (16 h, bzw. 8 h Lichtperiode) oder unter Lichtstreß-Bedingungen (16 h Lichtperiode bei einer Lichtleistung von $800 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$).

Des weiteren wurden oberflächensterile Samen auf ARA-Festmedien ausgelegt und in einer Phytokammer (16 h Lichtperiode) angezogen. Wie auch schon bei der Untersuchung der oberirdischen Pflanzenteile zeigten die Individuen gleicher Pflanzenlinien eine deutliche Varianz der Wurzellängen. Es konnten jedoch keine Unterschiede im Wurzelwachstum festgestellt werden, die mit einem *knockout* des *AtKC1*-Gens korrelierten.

Da durch die elektrophysiologischen Untersuchungen von Wurzelhaar-Protoplasten deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Atkc1-f*-Pflanzen gefunden wurden, sollte untersucht werden, ob sich die ionische Zusammensetzung der Nährmedien auf das Wachstum der unterschiedlichen Pflanzenlinien auswirken würde. Es wurden in zweifacher

Ausführung jeweils für eine definierter Nährstoffzusammensetzung 10 bis 12 oberflächensterile Samen von jeweils 2 homozygoten *knockout*- und 2 homozygoten Kontroll-Linien ausgebracht.

In einem ersten Versuch wurden H^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen variiert und die Parameter untereinander permutiert, so daß sich insgesamt 8 verschiedene Nährmedienbedingungen ergaben, z. B. $[H^+]_{hoch}$ $[K^+]_{hoch}$ $[Ca^{2+}]_{hoch}$, $[H^+]_{niedrig}$ $[K^+]_{hoch}$ $[Ca^{2+}]_{hoch}$, etc. Dabei wurden folgende Ionenkonzentrationen eingesetzt:

	Hoch	Niedrig
$[H^+]$	pH 5,8	pH 6,8
$[K^+]$	10 mM	10 μ M
$[Ca^{2+}]$	10 mM	10 μ M

Die beobachtbaren Unterschiede zwischen den Pflanzenlinien fielen gering aus und bewegten sich dabei innerhalb der statistischen Fehler (Standardabweichung). Einerseits ist es möglich, daß die gewählten Bedingungen einen eventuellen Phänotyp nicht deutlich hervortreten ließen. Andererseits ist es denkbar, daß ein eventuell subtiler Phänotyp des Pflanzenwachstums durch die recht hohe Heterogenität der Pflanzenlinien überdeckt wurde.

In weiteren Ansätzen wurden dem ARA-Medien in verschiedenen Konzentrationen unterschiedliche Kationen zugesetzt:

zugesetztes Kation	eingesetzte Konzentrationen
Rb^+	0, 0,3, 3, 30 mM
Cs^+	0, 10, 100, 1000 μ M
Al^{3+}	0, 10, 100 μ M

Doch auch hier konnte keine, dem Verlust des *AtKC1* zuschreibbare, phänotypische Änderung detektiert werden. Die Abnahme des Pflanzenwachstums fiel für alle untersuchten Linien in etwa gleich aus.

Der durch *patch clamp*-Analyse meßbare K^+_{in} -Strom in Epidermis- und Wurzelhaarzellen wird auf die Kaliumkanäle AKT1 und AtKC1 zurückgeführt (Hirsch *et al.*, 1998; Reintanz *et al.*, 2002). Hirsch *et al.*, (1998) konnte aber nachweisen, daß AKT1-

Nullmutanten vor allem dann einen ausgeprägten Wachstumsphänotyp zeigen, wenn unter Kaliummangelbedingungen ($[K^+] < 100 \mu M$) andere K^+ -Importsysteme in der Wurzel durch Zusatz von 2 mM Ammonium blockiert werden. In der elektrophysiologischen Analyse zeigte sich, daß Wurzelhaarprotoplasten von *Atkc1-f*-Pflanzen bei Zusatz von 1 mM Rb^+ zum Medium keinen K^+_{in} -Strom unter hyperpolarisierenden Bedingungen mehr zeigen, Kontrollpflanzen jedoch nur eine Reduktion um etwa 30 % (s. 3.1.4, Abb 3.19). Daher sollte unter den von Hirsch *et al.* (1998) publizierten Bedingungen und bei Zugabe von 1 mM Rb^+ zum Medium eine vollständige Unterdrückung des K^+_{in} -Stroms erfolgen und gleichzeitig der Kaliumtransport durch nicht-AKT1-Systeme blockiert werden, so daß *Atkc1-f*-Pflanzen kein Kalium aus dem Medium aufnehmen sollten. Nach Vermessung des Frischgewichtes der 7 Tage alten Keimlinge konnte jedoch kein signifikanter *AtKC1-knockout*-Phänotyp beobachtet werden (s. Abb.3.22).

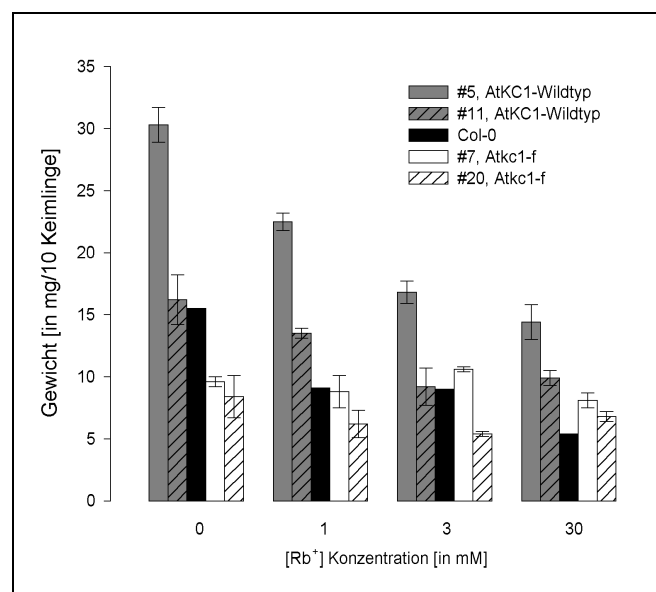


Abbildung 3.22. Darstellung der Verteilung des Frischgewichtes von Keimlingen unter verschiedenen Rb^+ -Konzentrationen. Es wurden *in duplica* 10 bis 20 Keimlinge pro Linie ausgewogen, wobei je 2 verschiedene *Atkc1-f*-Mutanten- und 2 verschiedene Kontrolllinien verwendet wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

3.2 Charakterisierung der Kaliumkanal- α -Untereinheit *KAT2*

Zu Beginn dieser Arbeit war ein partieller *KAT2*-Klon von Butt *et al.* (1997) veröffentlicht worden. Die mRNA wurde durch Northernblot-Analyse ausschließlich in Blättern nachgewiesen.

3.2.1 Isolierung der *KAT2*-cDNA

Aufgrund der niedrigen Transkriptionsrate des *KAT2*-Gens konnte keine vollständige cDNA isoliert werden. Experimente, in welchen aus verschiedenen Pflanzengeweben durch RT-PCR die komplette cDNA synthetisiert werden sollte, schlugen fehl. Daher sollten *Arabidopsis*-Pflanzen mit dem genomischen *KAT2*-Klon transformiert werden, welcher unter der Kontrolle des konstitutiven, starken *CaMV* 35S Promotors transkribiert wird, um so eine größere Menge der korrekt gespleißten mRNA zu erhalten.

3.2.1.1 Herstellung von *KAT2* überexprimierenden Pflanzenlinien

Durch PCR wurde ein 3.2 kb langes genomisches Fragment amplifiziert, welches für die K^+ -Kanaluntereinheit *KAT2* kodiert (s. 2.2.5.7, “PCR zur Isolierung des *KAT2* Gens”). Das PCR-Produkt umspannte die genomische DNA von nt -31 vor dem Start-ATG und zusätzlichen 110 bp nach dem Stop-ATT. Das Start-Codon wurde nach Sequenzhomologie mit dem *KAT1*-Gen und Genvorhersage der MIPS *Arabidopsis thaliana* Datenbank (<http://mips.gsf.de>) ermittelt.

Zur Herstellung des binären Vektors wurde der genomische *KAT2*-Klon als EcoRI/BamHI-Fragment in den Vektor pVKH-35S-pA1 (Reintanz, 1997) ligiert (Vektorkarte im Anhang 6.1). Der Vektor pVKH-35S-gen. *KAT2*-pA wurde über Agrobakterien-vermittelte Vakuuminfektion in *A. thaliana*-Pflanzen transformiert. Die geernteten Samen wurden auf Selektionsplatten ausgelegt und 15 der resistenten Pflanzen wurden für die anschließende Segregationsanalyse in Erde überführt und im Gewächshaus weiterkultiviert.

Um für die weiteren Analysen homozygote Pflanzen zu gewinnen, wurden von den 15 Pflanzen wiederum je 50 Samen auf Selektionsplatten ausgelegt. 6 Pflanzenlinien, die in

einem Verhältnis 3:1 (grau unterlegt) für die T-DNA segregierten und zwei weitere Linien wurden für die folgenden Untersuchungen verwendet.

Linie	nicht gekeimt	resistent	nicht-resistent	Verhältnis
1	2	37	12	3:1
2	4	44	4	11:1
3	6	43	3	14:1
4	26	40	7	6:1
5	23	37	5	7:1
6	5	38	11	3,5:1
7	9	32	15	2:1
8	1	45	3	15:1
9	10	28	17	1,6:1
10	12	30	3	10:1
11	2	29	9	3:1
12	4	37	8	4,6:1
13	2	37	17	2,1:1
14	5	44	4	11:1
15	4	38	5	7,6:1

Tabelle 3.1. Übersicht über die Segregationsanalyse der transformierten Pflanzen in der T₂-Generation. Je 50 Samen wurden in Kultur auf Hygromycin-haltigem Medium ausgelegt. Linien, die in einem Verhältnis von 3:1 segregierten (resistent : nicht-resistent) sind grau unterlegt.

Für die nachfolgende Klonierung der *KAT2*-cDNA war es wichtig, vor allem Linien hoher Transkriptionsrate zu verwenden. Daher wurde von den 3:1-segregierenden und zweier zusätzlicher Linien Poly (A⁺) RNA isoliert und eine Northernblot-Analyse durchgeführt. Als Hybridisierungssonde wurde ein 860 bp Fragment des 5'-Endes der *KAT2*-cDNA verwendet, welches nach Restriktionsverdau durch SacI und KpnI gewonnen wurde.

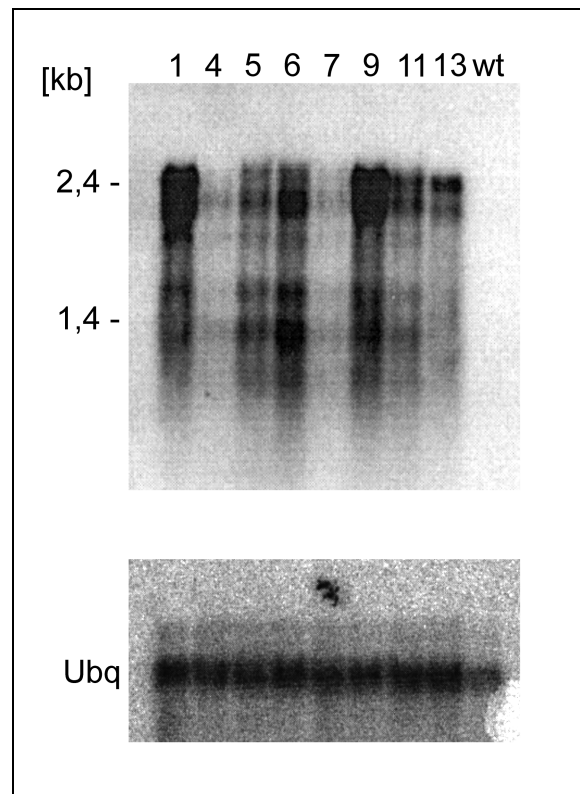


Abbildung 3.23. Autoradiogramm der Northernblot-Analyse von Poly (A⁺) RNA, isoliert aus transgenen Pflanzen (Spuren 1, 4, 5, 6, 7, 9, 11 und 13), die das *KAT2*-Gen unter der Kontrolle des *CaMV* 35S Promotors transkribieren. Zum Vergleich ist Poly (A⁺) RNA von Columbia Wildtyp-Pflanzen (wt) aufgetragen. Um die RNA-Mengen der unterschiedlichen Präparationen vergleichen zu können, wurde die Membran nach Entfernen der *KAT2*-Signale mit einer Ubiquitin-spezifischen Sonde hybridisiert (Autoradiogramm Ubq).

Während vor allem die Linien 1, 6 und 9 eine starke *KAT2*-Transkription zeigten, war nur ein schwaches Signal in den Linien 4 und 7 zu detektieren (Abb.3.23). In der Poly (A⁺) RNA-Isolation der Wildtyp-Kontrolle konnte hingegen kein *KAT2*-spezifisches Signal nachgewiesen werden. In allen Spuren lag das stärkste Signal bei einer Länge von etwa 2,4 kb. Dies entspricht der Größe der vollständigen, korrekt gespleißten mRNA. Die Signale geringerer Größe könnten wegen des distinkten Bandenmusters und der Wahl der Hybridisierungssonde 3'-terminal verkürzte RNAs gewesen sein, welche möglicherweise durch inkorrektes Spleißen zustande kamen.

3.2.1.2 Klonierung der *KAT2*-cDNA

Poly (A⁺) RNA wurde aus 4 verschiedenen Pflanzenlinien gewonnen und vereinigt. Die cDNA wurde durch RT-PCR amplifiziert und in den Vektor pBlueskript kloniert. Der so gewonnene Klon pBlueskript KAT2 wurde nach Kontrolle durch Sequenzierung für die weiteren Experimente verwendet (Vektorkarte im Anhang 6.1).

3.2.2 Elektrophysiologische Untersuchungen

3.2.2.1 Expression in Sf9-Zellen

Zur elektrophysiologischen Untersuchung der KAT2- α -Untereinheit wurde die *KAT2*-cDNA aus dem Vektor pBlueskript in den Transfervektor pFastBac1 kloniert (Vektorkarte im Anhang 6.1). Nach Transfektion und Amplifikation des rekombinanten Virus wurden Zellen, die auf Objektträgern ausgebracht wurden, infiziert und nach etwa 24 bis 48 h p. i. untersucht.

Sf9-Zellen, die mit dem rekombinanten Virus vir-KAT2 infiziert wurden, zeigten unter hyperpolarisierenden Bedingungen negativer als -80 mV einen spannungsabhängigen, einwärtsgerichteten Strom mit schneller Öffnungskinetik (s. Abb. 3.24 A). Zum Vergleich wurden Sf9-Zellen nach Infektion mit dem rekombinanten Virus vir-KAT1 vermessen: Es konnte ein vergleichbarer Strom-Spannungs-Verlauf festgestellt werden (Abb. 3.24 C), wobei der KAT1-vermittelte Strom mit einer langsameren Kinetik zunimmt (Abb. 3.24 B). Damit konnte die Funktionalität der K⁺-Kanal- α -Untereinheit KAT2 in Sf9-Zellen nachgewiesen werden. Nicht-infizierte Sf9-Zellen zeigten unter den beschriebenen Bedingungen keinen spannungsabhängigen Ionenstrom (nicht gezeigt).

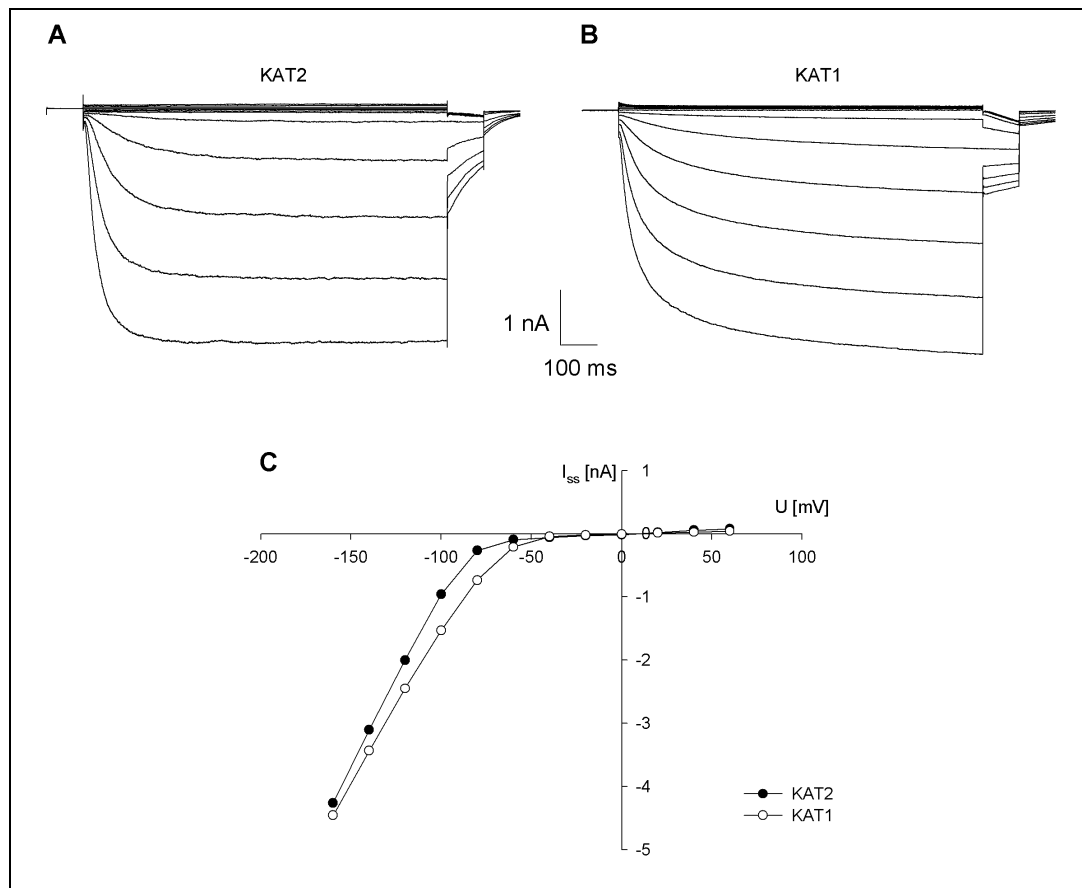


Abbildung 3.26. Patch clamp-Analyse in der Ganzzell-Ableitung von Sf9 Zellen nach Infektion mit vir-KAT2 und vir-KAT1. Gezeigt sind typische Stromspuren von mit vir-KAT2 infizierten (A) und von mit vir-KAT1 infizierten Sf9-Zellen (B). (C) Im I/U-Diagramm sind die *steady state*-Ströme I_{ss} gegen das angelegte Membranpotential U aufgetragen (●: KAT2; ○: KAT1).

3.2.2.2 Expression in *X. laevis* Oozyten

Zur elektrophysiologischen Untersuchung der KAT2- α -Untereinheit in *X. laevis* Oozyten wurde die KAT2-cDNA in den Vektor pGEMHE kloniert (Vektorkarte im Anhang 6.1). Dieser Vektor wird zur *in vitro*-Transkription von cRNA verwendet und kodiert 5' und 3' des Gens für den nicht-translatierten 5'- und 3'-Bereich von *X. laevis* β -Globin, was die cRNA in Oozyten stabilisiert (Liman *et al.*, 1992). Die isolierte cRNA wurde in Oozyten injiziert, welche anschließend elektrophysiologisch vermessen wurden.

Die Expression von KAT2 in *X. laevis* Oozyten zeigte unter hyperpolarisierenden Bedingungen negativer als -100 mV einen einwärtsgerichteten spannungsabhängigen Strom (Abb. 3.25 A). Die Auftragung des *steady state*-Stroms gegen die angelegte Membranspannung zeigt eine Aktivierungsschwelle des KAT2-Kanals bei etwa -100 mV

(Abb. 3.25 B). Die extrazelluläre Kaliumkonzentration änderte nicht die Spannungsabhängigkeit des Öffnungsverhaltens.

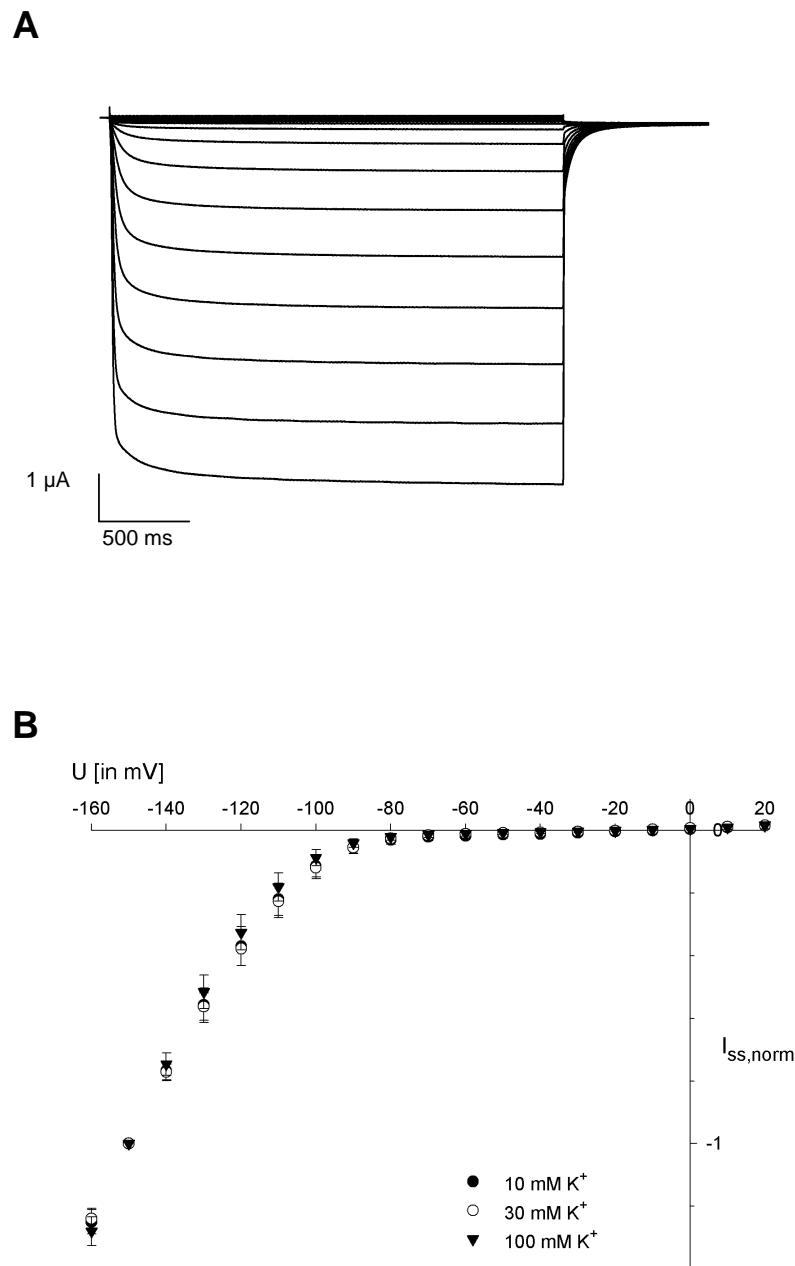


Abbildung 3.25. Patch clamp-Analyse von *X. laevis* Oozyten nach Injektion mit *KAT2*-cRNA. (A) Ausgehend von einem Haltepotential von -20 mV wurden von 20 mV bis -160 mV in 10 mV-Inkrementen Spannungspulse von 2,5 s Dauer angelegt. Dargestellt ist eine typische Stromspur. (B) Zur Ermittlung der I/U-Diagramme bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen in der Perfusionslösung wurde zum Ende des Einzelspannungspulses die Plateaustromstärke (*steady state*) gemessen und gegen die angelegte Membranpotential aufgetragen. Die Stromstärken wurden bei Kaliumkonzentrationen von 10 mM (●), 30 mM (○) und 100 mM (▼) bestimmt. Die Stromstärken wurden auf ein Membranpotential von $U = -150$ mV normiert. Es wurden jeweils 9 Oozyten vermessen.

Zur Analyse der Ionenselektivität des durch KAT2 vermittelten K^+ -Transportes wurde eine *tail current*-Analyse durchgeführt (s. a. 2.17). Aus der Auftragung des Umkehrpotentials E_{rev} gegen die K^+ -Konzentration in logarithmischer Skala (s. Abb. 3.26) konnte durch Interpolation die Geradengleichung bestimmt werden:

$$E_{rev} = -114 \text{ mV} + 51,7 \text{ mV} \cdot \log [K^+]_{ex}$$

Die NERNSTsche Gleichung für Kalium ist gegeben als

$$E_{rev} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[K^+]_{ex}}{[K^+]_{cyt}}$$

und kann umgeformt werden zu

$$E_{rev} = -2,303 \cdot \frac{RT}{zF} \cdot \log [K^+]_{cyt} + 2,303 \cdot \frac{RT}{zF} \cdot \log [K^+]_{ex}$$

Wird für die cytosolische Kaliumkonzentration in Oozyten ein mittlerer Wert von 109 mM angenommen (Weber, 1999), so ergibt sich für die NERNSTsche Gleichung bei einer Temperatur von 25°C (298,15 K) ein numerischer Wert von:

$$E_{rev} = -120,5 \text{ mV} + 59,16 \text{ mV} \cdot \log [K^+]_{ex}$$

Die experimentell ermittelten Werte sind in guter Übereinstimmung mit den theoretischen, so daß unter den experimentellen Ionenbedingungen von einem Kalium-selektiven Kanal ausgegangen werden kann.

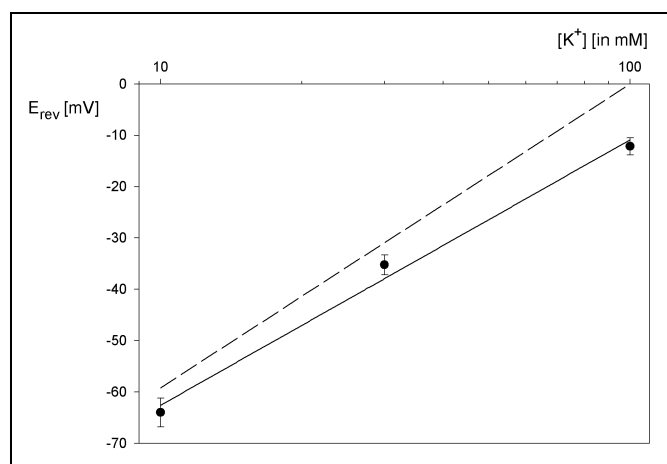


Abbildung 3.26. Bestimmung der Ionenselektivität. Die durch *tail current*-Analyse ermittelten Umkehrpotentiale E_{rev} sind im Diagramm gegen die Kaliumkonzentrationen der perfundierenden Lösung im logarithmischen Maßstab aufgetragen. Die durchgehende Linie entspricht der durch Interpolation errechneten Geradengleichung, die gestrichelte der theoretischen Geradengleichung aufgrund der NERNSTschen Gleichung.

Um die relativen Permeabilitäten von KAT2 für andere Kationen zu untersuchen, wurde KCl in der Perfusionslösung sukzessive durch RbCl, NH₄Cl, NaCl und LiCl ersetzt. Die Permeabilitäten werden relativ zur Permeabilität von K⁺ (gleich 1) angegeben. Dann ergaben sich die relativen Permeabilitäten der untersuchten Kationen wie in Tabelle 3.2 aufgelistet:

Kation	rel. Permeabilität	n
K ⁺	1	7
Rb ⁺	0,27	7
NH ₄ ⁺	0,13	8
Na ⁺	0,08	3
Li ⁺	0,08	5

Tabelle 3.2. Übersicht über die relativen Permeabilitäten von Rb⁺, NH₄⁺, Na⁺ und Li⁺ gegenüber K⁺. n: Anzahl Experimente (Oozyten)

Die ermittelte Reihenfolge der relativen Permeabilitäten entspricht der EISENMAN-Serie V; sie ist also typisch für einen einwärtsgerichtenden Kaliumkanal (Schroeder *et al.*, 1994).

Kaliumkanäle können durch Protonen reguliert werden, wobei eine extrazelluläre Ansäuerung aktivierend (KAT1) oder reprimierend (KAT2/3) wirken kann. Eine cytosolische Azidifizierung reduziert KAT1-vermittelte K_{in}⁺-Ströme (Hoshi, 1995). In KAT2-exprimierenden Oozyten konnte durch extrazelluläre Ansäuerung von pH 7,5 zu pH 5,6 eine Zunahme des einwärtsgerichteten Kaliumstroms um etwa 46 % bei einer Membranspannung von -150 mV gezeigt werden, während ein weiterer Anstieg der Protonenkonzentration zu pH 4,5 keine Auswirkungen hatte (Abb. 3.27 A).

Zur Änderung des intrazellulären pH-Wertes wird die Oozyte mit einer 5 mM Natriumacetat-Lösung perfundiert, was zu einer cytosolischen Azidifizierung um etwa 0,2 pH-Einheiten führt, obwohl von einer höheren lokalen [H⁺]_{cyt} in unmittelbarer Membrannähe ausgegangen werden kann (Lacombe *et al.*, 2000). Eine Ansäuerung des intrazellulären Milieus führte zu einer Erhöhung des KAT2-vermittelten K_{in}⁺-Stroms um etwa 82 % bei einer Membranspannung von -150 mV (Abb 3.27 B).

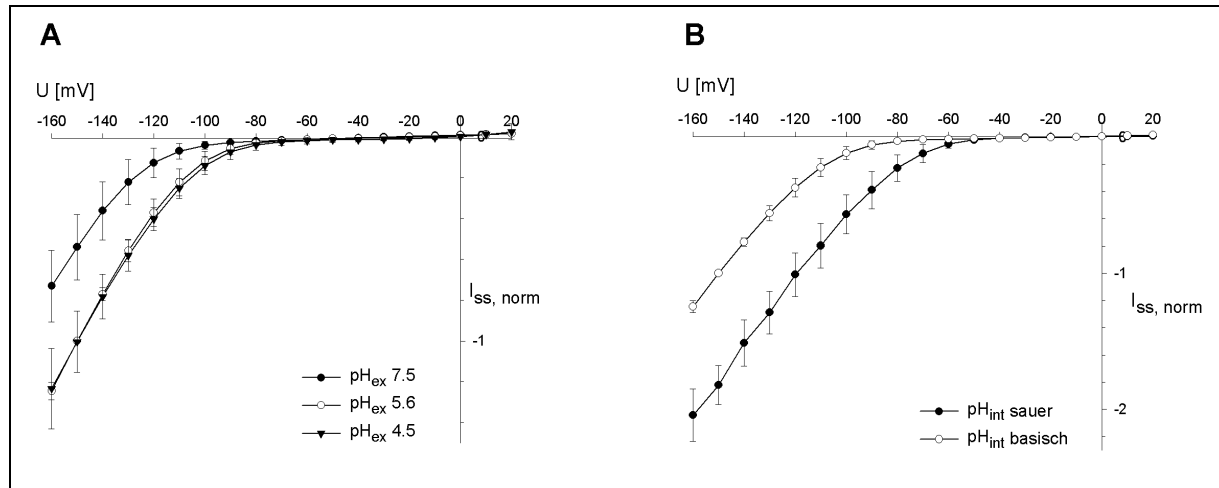


Abbildung 3.27. Patch clamp-Analyse des Effektes von extrazellulären und intrazellulären pH-Änderungen auf den KAT2-vermittelten K^+ -Strom. Das Spannungsprotokoll war wie in Abb. 3.25 beschrieben. Im Diagramm wurde der *steady state*-Strom auf die Stromstärke bei einem pH von 5,6 und einem Membranpotential von $U = -150$ mV genormt (A), in Diagramm (B) auf die Stromstärke bei einer Perfusionslösung ohne Natriumacetat und einem Membranpotential von $U = -150$ mV. (A) Auftragung der genormten *steady state*-Ströme ($I_{ss, \text{norm}}$) gegen das angelegte Membranpotential U in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert; \bullet : pH = 7,5 ($n = 13$), \circ : pH = 5,6 ($n = 15$), \triangle : pH = 4,5 ($n = 6$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (B) Auftragung der genormten *steady state*-Ströme ($I_{ss, \text{norm}}$) gegen das angelegte Membranpotential U in Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert; \circ : Perfusionslösung ohne Natriumacetat (alkalischere intrazelluläre Bedingung; $n = 15$), \bullet : Perfusionslösung mit Natriumacetat (saurere intrazelluläre Bedingung; $n = 16$). n : Anzahl Experimente (Oozyten)

Für die K^+ -Kanal- α -Untereinheit KAT1 konnte eine spannungsabhängige Inhibierung durch Cs^+ gezeigt werden (Ichida und Schroeder, 1996; Becker *et al.*, 1996). Zur Untersuchung der Cs^+ -Sensitivität von KAT2 wurden Oozyten mit einer 5 mM CsCl-Lösung perfundiert. In der patch clamp-Analyse zeigte sich die potentialabhängige Blockierung von KAT2-abhängigen K^+ -Strömen, d. h. bei stärker negativen Membranpotentialen nahm die Unterdrückung des K^+ -Stroms zu (Abb. 3.28). Bei einer Membranspannung von -150 mV lag die Inhibierung durch 5 mM Cs^+ bei etwa 72 %.

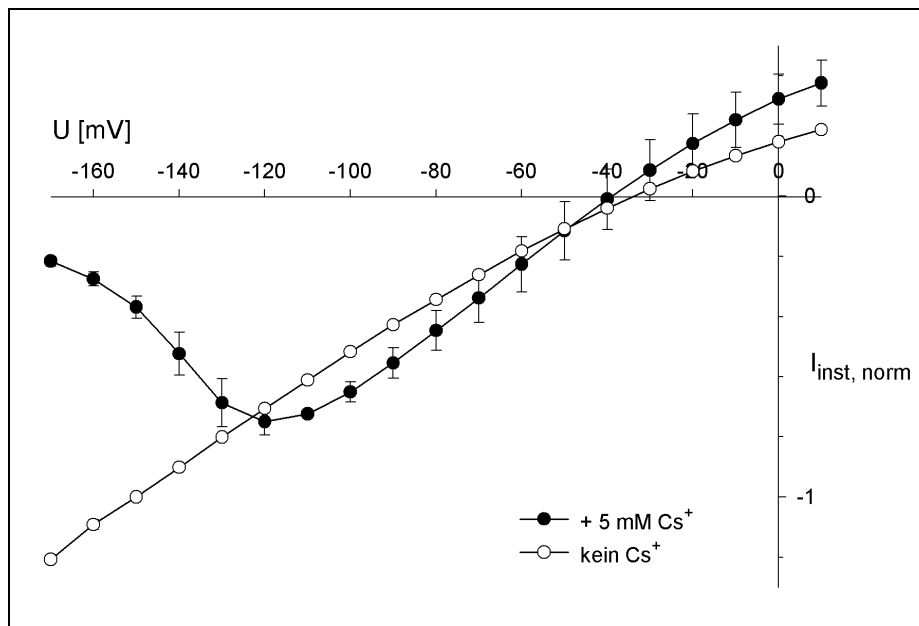


Abbildung 3.28. Patch clamp-Analyse des Effektes von extrazellulärem Cs⁺ auf den KAT2-vermittelten K⁺_{in}-Strom. Das Spannungsprotokoll was wie in Abb. 3.25 beschrieben. Der instantane Strom wurde auf die Stromstärke bei einer Perfusionslösung ohne Cs⁺ und bei einem Membranpotential von U = -150 mV genormt (I_{inst, norm}). Gezeigt ist die Auftragung von I_{inst, norm} gegen das angelegte Membranpotential in Abhängigkeit von Cs⁺. ○: Perfusionslösung ohne CsCl, ●: Perfusionslösung mit 5 mM CsCl.

3.2.3 Untersuchung zur Aktivität des KAT2-Promotors

Zur Untersuchung der Promotoraktivität eines Gens werden sogenannte Promotor-Reporter-Konstrukte verwendet: Der Promotor eines Gens wird vor das Reportergen *uidA*, welches für β -Glucuronidase kodiert, in einen geeigneten Transfervektor kloniert. Über *Agrobacterium*-vermittelte Transformation werden transgene Pflanzen hergestellt, die unter der transkriptionellen Kontrolle des KAT2-Promotors β -Glucuronidase exprimieren (Spoormaker, 1998). Nach histochemischer Anfärbung mit dem Substrat X-Gluc, welches gespalten und nach Oxidation zu Indigo umgesetzt wird, können die Gewebe und Zellen sichtbar gemacht werden, in welchen eine Transkription von β -Glucuronidase erfolgt.

Bisher wurde gezeigt, daß KAT2 in Keimlingen und jungen Pflanzen vor allem im Zentralzylinder des Hypokotyls und der Hauptwurzel und in der Hauptader des vaskulären Systems im Blatt transkribiert wird (Spoormaker, 1998).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß KAT2 eine Rolle in der Blütenentwicklung spielt (Abb. 3.29). Für die Bezeichnung der einzelnen Stufen der Blütenentwicklung und Schotenreife wurde das System von Smyth *et al.* (1990; Übersicht in Ferrándiz *et al.*, 1999) angewendet. In der noch geschlossenen Knospe überspannen die

Petalen die langen Stamina (Stufe 12); dies ist die letzte Stufe vor Öffnung der Knospe und der Anthese. Das Karpell zeigte Färbung im apikalen Bereich, genauer in Narbe, Griffel und dem oberen Bereich des Ovars (Abb. 3.29). Im Verlauf dieser Stufe finden vor allem Wachstums- und Differenzierungsprozesse des Gynoeciums statt.

In der weiteren Entwicklung bis hin zur vollständigen Reifung der Schote konnte ein Rückgang der Färbung im apikalen Bereich und eine Zunahme im basalen Teil, der Abscissionszone, beobachtet werden. Nach Abstoßung der Sepalen und Petalen (Stufe 16) konnte ein Zwischenstadium beobachtet werden, wobei eine leichte Färbung der Stamina auftrat. Nach der Abreifung der Schote, noch bevor diese aufplatze (Stufe 18), ist nur noch eine Färbung im Bereich um die Abszissionszone zu detektieren (Abb. 3.29).

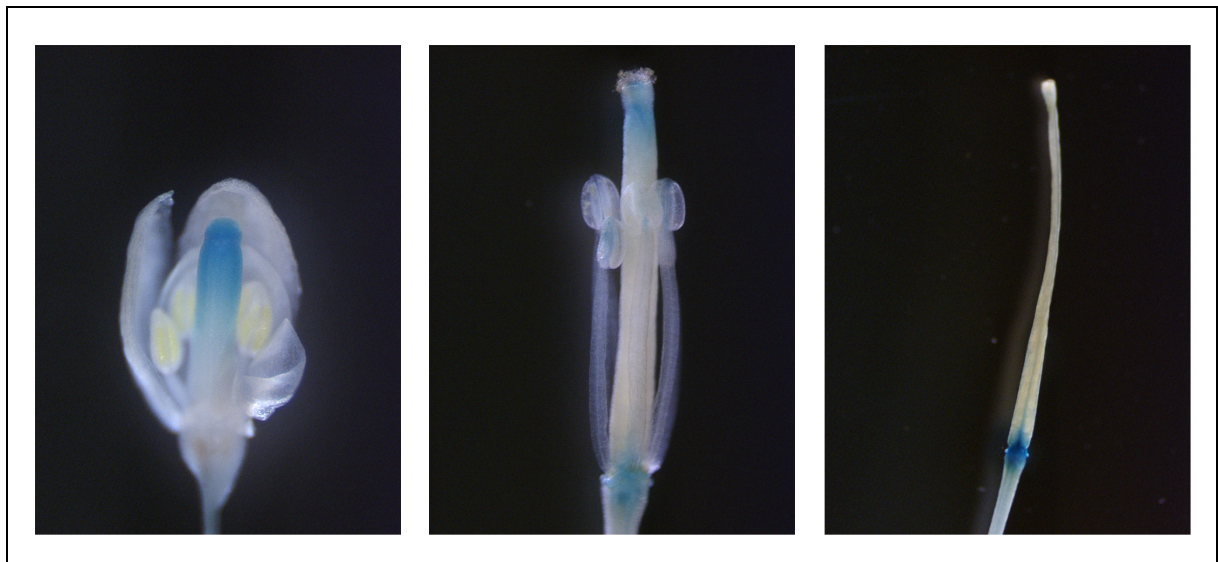


Abbildung 3.29. Gezeigt sind mit X-Gluc gefärbte Pflanzengewebe. Von links nach rechts: Noch geschlossene Blüte (Stufe 12), wobei zur Übersicht die vorderen Sepalen und Petalen entfernt wurden; befruchtete, sich entwickelnde Schote mit noch verbliebenen Stamina (Stufe 16); abgereifte, gelbe Schote (Stufe 18).

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die *KAT2*-Promotoraktivität innerhalb der Keimlingsentwicklung deutlich variiert. In der gerade gekeimten Pflanze zeigt sich Promotor-Aktivität ubiquitär in allen Geweben (Abb. 3.30). Während der frühen Keimlingsentwicklung nimmt die Transkriptionsrate in der Wurzel immer weiter ab, bis nur noch ein Signal in der Wurzelspitze detektierbar ist. In diesen Entwicklungsstadien ist Promotor-Aktivität vor allem im Hypokotyl und in den Kotyledonen zu beobachten.

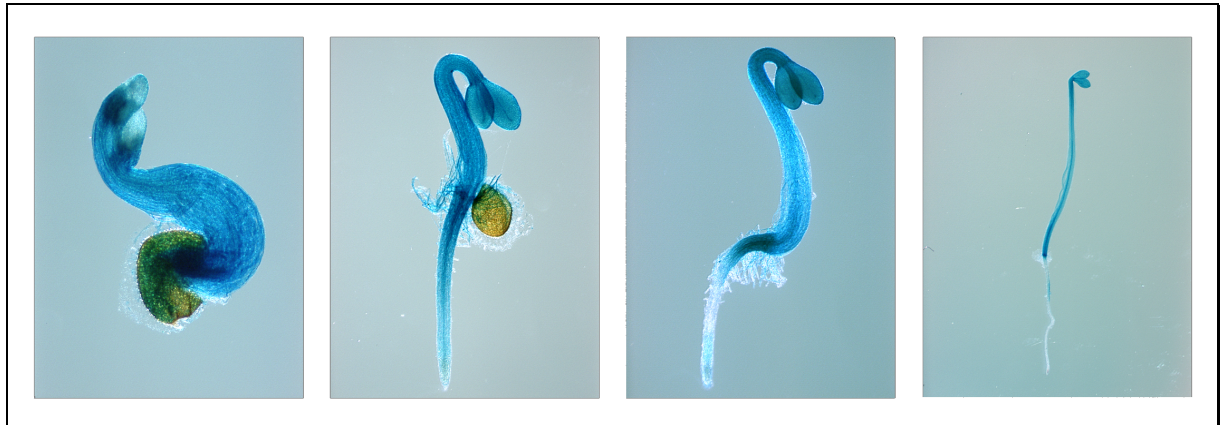


Abbildung 3.30. Gezeigt sind mit X-Gluc gefärbte Pflanzen in unterschiedlichen Keimlingsstadien. Von links nach rechts betrug das Alter nach Keimung: 1 d; 2 d; 3 d; 5 d.

“Ich habe inzwischen viele schöne Hypothesen, aber bisher noch kein evidentes Faktum, das mir zu sagen gestattet, welche die richtige ist. Und damit ich nicht hinterher dumm dastehe, verzichte ich lieber jetzt darauf, als klug zu erscheinen.”

[...] “Aber dann”, wagte ich zu bemerken, “seid Ihr noch weit von der Lösung entfernt...”

“Wir sind ihr bereits ganz nahe”, entgegnete William heiter, “ich weiß nur noch nicht, welcher.”

4 Diskussion

4.1 Arbeiten zur Lokalisation und Funktion von AtKC1

4.1.1 Lokalisation von AtKC1

Die Analyse der gewebe- und zellspezifischen Expression eines Gens erlaubt Rückschlüsse auf die mögliche Funktion des kodierten Proteins *in planta*. AtKC1 wurde durch Promotor-GUS-Analysen in der Wurzel, genauer in den Wurzelhaaren, in Epidermis, Cortex und Endodermis nachgewiesen (Reintanz *et al.*, 2002). Dies führte zu der Annahme, daß AtKC1 bei der Kaliumaufnahme aus dem Boden beteiligt ist.

Durch Promotor-GUS-Analyse konnte keine Aussage zur subzellulären Lokalisation gemacht werden. Für die weitere Analyse war es daher essentiell, AtKC1 intrazellulär exakt zu lokalisieren.

Westernblot-Analysen von FFE-Membranfraktionen. Durch *Freeflow*-Elektrophorese (FFE) wurde die mikrosomale Mischfraktion in reine Fraktionen von Plasmamembran, mitochondriale und nukleäre Membranen sowie Tonoplasten aufgetrennt (Canut *et al.*, 1996). Die anschließende Westernblot-Analyse dieser Membranfraktionen zeigte, daß AtKC1 ausschließlich in der Plasmamembran-Fraktion bei einer apparenten relativen molekularen Masse von etwa 76 kDa detektiert wird, was gut mit der theoretischen Masse von 75,6 kDa übereinstimmt. Hierdurch konnte zum ersten Mal die Plasmamembran-Lokalisierung eines K⁺-Kanals direkt in *A. thaliana* erbracht werden.

Auf Grund einer Proteinsequenz-Analyse durch das Programm TargedP (Emanuelsson *et al.*, 2000) wurde eine intrazelluläre Lokalisation von AtKC1 in den Chloroplasten prognostiziert. Durch Vergleich der apparenten relativen Molekularmasse von

nativem AtKC1 in mikrosomalen Proteinfractionen mit jenem von rekombinantem aus Sf9 sowie der entsprechenden N-terminalen Deletionsmutante AtKC1 Δ _{N52} konnte gezeigt werden, daß AtKC1 keine proteolytisch abspaltbare Signalsequenz besitzt, wie sie für viele Chloroplastenproteine typisch ist. Die mikrosomalen Proteinfractionen der FFE sind aus etwa 7 Tage alten Keimlingen gewonnen. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß AtKC1 in einem späteren Entwicklungsstadium Kaliumtransport über eine Chloroplastenmembran vermittelt. Die GUS-Studien zeigen jedoch Promotor-Aktivität, neben Wurzeln, in Blattprimordien, Hydathoden und Trichomen (Reintanz *et al.*, 2002), weisen also auf photosynthetisch inaktives Gewebe hin, so daß eine Lokalisierung von AtKC1 in Chloroplasten unwahrscheinlich erscheint.

Nachweis des AtKC1-Proteins *in planta*. Die Aufnahme von Kalium aus dem Boden erfolgt in der Wurzel, neben einem anfänglichem apoplastischen Transport, vor allem durch zwei Zelltypen: Wurzelhaare und Endodermiszellen (Tester und Leigh, 2001). Die Endodermis stellt mit dem CASPARI-Streifen die Grenze dar, an welcher der apoplastische Kaliumtransport endet und in den symplastischen übergeht. Wird für AtKC1 eine Funktion bei der K⁺-Aufnahme in Wurzeln angenommen, so kann vermutet werden, daß das Protein in Endodermiszellen polar lokalisiert ist, d. h. nur in der zentripetal gelegenen Zellmembran.

Um die Verteilung von AtKC1 in der Wurzel zu untersuchen, wurden zwei Ansätze verfolgt: *whole mount*-Immunfluoreszenzfärbung und Analyse von AtKC1::GFP überexprimierenden Pflanzen.

Die *whole mount*-Immunfluoreszenzfärbung nutzt eine Reihe von Fixierungs- und Permeabilisierungsschritten, so daß Antikörper in das Zellinnere gelangen können. Durch Vergleich mit den AtKC1-*knockout*-Mutanten (s. 4.1.2) wurden jedoch nur unspezifische Signale detektiert. Eine Ursache hierfür könnte die niedrige Translationsrate von AtKC1 sein, die die Beobachtung spezifischer Fluoreszenzsignale vor einem unspezifischen Hintergrund unmöglich macht.

Die Expression von AtKC1::GFP-Fusionsproteinen zeigte kein GFP-spezifisches Signal in hygromycin-resistenten Pflanzen. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine strikte transkriptionelle oder translationale Kontrolle der AtKC1-Proteinmenge sein. Zur Detektion von zellulären Fluoreszenzsignalen wird eine minimale Kopienzahl von einigen zehntausend GFP-Molekülen pro Zelle diskutiert (Godde *et al.*, 1999). Die K⁺-Kanaldichte in

Schließzellen beispielsweise wurde bei abgeschätzten Einzelkanalleitfähigkeiten (etwa 5 bis 7 pS) auf etwa 10^3 je Zelle bestimmt (Hedrich und Schroeder, 1989). Demnach könnte eine direkte Beobachtung von Fluoreszenzsignalen problematisch sein.

Heterologe Expression von AtKC1. Nachdem gezeigt werden konnte, daß AtKC1 ein in der Plasmamembran lokalisiertes Protein ist, wurde rekombinantes AtKC1 in Sf9-Zellen exprimiert. Die Expression der K^+ -Kanal- α -Untereinheit konnte in infizierten Sf9-Zellen sowohl durch Westernblot-Analyse als auch durch Immunfluoreszenzfärbung fixierter Zellen gezeigt werden. AtKC1 wurde innerhalb der Zelle jedoch ausschließlich im ER detektiert. Um die subzelluläre Lokalisierung zu ändern, d. h. eine Plasmamembran-Lokalisierung von AtKC1 zu erreichen, wurden verschiedene N- und C-terminale Deletionskonstrukte und eines sekretorischen Signalpeptid-AtKC1-Fusionskonstruktes in Sf9-Zellen exprimiert, die jedoch alle im ER detektiert wurden. Damit scheint das Baculovirus-Sf9-Expressionssystem nicht geeignet, AtKC1 in der Plasmamembran zu exprimieren, um eine elektrophysiologische Analyse zu ermöglichen. Alternativ zum Sf9-Zellsystem wurde ein AtKC1::GFP-Fusionsprotein in BY2-Tabaksuspensionszellen exprimiert. Wiederum wurde das Fluoreszenzsignal nur im ER beobachtet.

Welche Faktoren für die ER-Retention von AtKC1 verantwortlich sind, konnte nicht geklärt werden. Es ist möglich, daß ein weiterer, im heterologen System fehlender Faktor, wie z. B. eine andere gewebe-, zell- oder entwicklungsspezifisch exprimierte K^+ -Kanal-Untereinheit, die Translokation zur Plasmamembran verhindert. Bei der Analyse in heterologen Expressionssystemen wird oftmals vorausgesetzt, daß das rekombinante Protein wie im homologen System lokalisiert. Jedoch konnte z. B. im Fall von KCO1 gezeigt werden, daß der rekombinante K^+ -Kanal an die Plasmamembran transportiert wird (Czempinski *et al.*, 1997), während *in planta* KCO1 in den Tonoplasten integriert wird (Schönknecht *et al.*, 2002).

4.1.2 Funktion von AtKC1

Elektrophysiologische Untersuchungen an infizierten Sf9-Zellen. Zur funktionellen Analyse von AtKC1 wurden sowohl heterologe als auch homologe Systeme verwendet. Heterologe Systeme bieten verschiedene Vorteile: Die Menge des rekombinanten Proteins ist relativ hoch, die Zellen sind den Elektroden leicht zugänglich und es ist oft keine störende endogene Kanalaktivität vorhanden. In der vorliegenden Arbeit zur Charakterisierung von AtKC1 wurde als Expressionssystem Sf9-Zellen verwendet

Sf9-Zellen wurden nach Infektion mit den rekombinanten Viren, welche die Expression der verschiedenen AtKC1-Konstrukte vermitteln, elektrophysiologisch vermessen. Bei der Detektion von funktionellen K^+ -Kanal- α -Untereinheiten ist die *patch clamp*-Analyse im Gegensatz zur Immunfluoreszenz-Mikroskopie wesentlich sensitiver. Es konnte jedoch in keiner der infizierten Zellen ein spannungsabhängiger K^+ -Strom festgestellt werden. Folgende Möglichkeiten können als Ursache diskutiert werden:

- AtKC1 wird vollständig im ER zurückgehalten, bzw. in solch geringen Mengen in die Plasmamembran integriert, daß eine elektrophysiologische Analyse nicht möglich ist.
- AtKC1 wird in geringen Mengen in die Plasmamembran integriert, kodiert jedoch für einen "stillen" K^+ -Kanal, ist also selber nicht funktionell, hat jedoch modulatorische Funktion in Komplexen mit anderen K^+ -Kanal- α -Untereinheiten. In *X. laevis* Oozyten, die ebenfalls keine funktionellen AtKC1-Homomere exprimieren, konnte die modulierende Wirkung von AtKC1 auf KST1 und eine KAT1-Punktmutante nachgewiesen werden (Dreyer *et al.*, 1997). Dies ist auch in Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen der AtKC1-*knockout*-Mutante (s. unten). Diese „stillen“ α -Untereinheiten findet man auch unter den tierischen K_v -Kanalfamilien K_v5 , 6, 8 und 9. Keines dieser Gene konnten bisher funktionell in *X. laevis* Oozyten exprimiert werden. Koexpressionsstudien zeigten allerdings, daß K_v8 Heteromultimere mit K_v2 und K_v3 bildet und derart zu einer Reduktion, bzw. vollständigen Inhibierung der Kaliumströme führt (Hugnot *et al.*, 1996). Diese Studien belegen, daß α -Untereinheiten, die als Homomere nicht funktionell sind, erheblichen Einfluß auf Kinetik und Schaltverhalten anderer α -Untereinheiten haben können.
- Der in die Plasmamembran integrierte homomere AtKC1-Kanal könnte erst bei sehr negativen Membranpotentialen öffnen, d. h. in den leitenden Zustand übergehen, so daß

mittels der bekannten Expressionssysteme dieser Spannungsbereich nicht untersucht werden kann.

Isolierung der *En-1*-Insertions- und der *footprint*-Mutante. Um den Einfluß von AtKC1 auf das Gesamt-Kaliumkanal-Ensemble in Wurzeln zu untersuchen, wurden unter 1700 Pflanzen einer *En-1*-mutagenisierten Linie 2 *knockout*-Linien identifiziert: (1) In der Linie AtKC1-1294 reinserierte das Transposon in das 5. Exon des *AtKC1*-Gens. (2) In der Linie Atkc1-f wurde durch ein Exzisionsereignis der En-258-Insertion eine stabile Änderung der Basenabfolge erzeugt, so daß sich nach dem für Ala₆₂ kodierenden Triplet ein Stop-Codon ergab. Beide Linien waren für die jeweilige Mutation homozygot.

Durch RT-PCR konnte gezeigt werden, daß der *AtKC1*-Transkriptspiegel in der Linie AtKC1-1294 stark reduziert ist. Der Restgehalt an *AtKC1*-mRNA in dieser Insertionsmutante kann auf somatische Reversion zurückgeführt werden, welche bis zu 15 % betragen kann (Cardon *et al.*, 1993). In der Linie Atkc1-f wurde, bei geringerer Größe des PCR-Produktes, eine weitgehend unveränderte *AtKC1*-mRNA-Menge gefunden. Mittels Westernblot-Analyse konnte nachgewiesen werden, daß in der mikrosomalen Proteinfraction die AtKC1-Menge in der Linie AtKC1-1294 deutlich vermindert, in der Linie AtKC1-f nicht mehr detektierbar war.

Damit konnten zwei neue Nullmutantenlinien etabliert und in Bezug auf ihre AtKC1-Expression charakterisiert werden.

Elektrophysiologische Untersuchungen an Wurzelhaar-Protoplasten. Nach Isolierung der Atkc1-f-Nullmutante konnte durch Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften von Protoplasten aus Atkc1-f-Linien und Kontrollpflanzen der Einfluß von AtKC1 auf den K⁺_{in}-Strom in Wurzelhaaren ermittelt werden. Es wurden Unterschiede festgestellt in der Öffnungskinetik, dem Einfluß des pH-Wertes und der Inhibierung durch Rb⁺- und Ca²⁺-Ionen.

Durch die veränderte Rb⁺- und Ca²⁺-Empfindlichkeit von Atkc1-f- im Vergleich zu Wildtyp-Protoplasten konnte gezeigt werden, daß AtKC1 eine Komponente der Kanalpore des funktionellen Kaliumkanals in Wurzelhaaren ist. Darüber hinaus ist AtKC1 an der pH-Regulation des K⁺-Kanals beteiligt. Die als pH-Sensor diskutierte Aminosäure, ein Histidin C-terminal der Signatursequenz (Position 22 der Konsensussequenz, Abb. 1.6), ist in allen

pflanzlichen *Shaker*-Kanälen konservierte (Hoth *et al.*, 1997). Durch die Ausschaltung der AtKC1- α -Untereinheit zeigt der Rest-Kanal jedoch eine umgekehrte pH-Abhängigkeit, obwohl die noch aktiven 6TM1P-Kanäle gleichermaßen durch dieses Histidin reguliert werden könnten. Es muß also mindestens eine weitere Aminosäure in der pH-abhängigen Regulation der Kaliumkanäle vermutet werden. Es ist auch möglich, daß die Weitergabe des pH-Signals innerhalb des Kanalproteins abhängig von der Zusammensetzung des Tetramers ist.

AtKC1 ist beim Kaliumtransport in Wurzelhaaren unter den verwendeten Bedingungen nicht essentiell: In *Atkc1-f*-Protoplasten kann unter hyperpolarisierenden Membranpotentialen noch ein K^+_{in} -Strom gemessen werden, während dieser in *AKT1-knockout*-Pflanzen (*akt1-1*) nicht mehr nachzuweisen ist (Hirsch *et al.*, 1998; Reintanz *et al.*, 2002). Dies belegt, daß durch *knockout* der AKT1- α -Untereinheit die Hauptkaliumleitfähigkeit in Wurzelhaaren ausgeschaltet ist. Wird angenommen, daß in *Atkc1-f*-Pflanze vor allem die AKT1- α -Untereinheit die verbliebene Kaliumkanal-Aktivität ausmacht, trotz auffälliger Unterschiede in der Abhängigkeit vom pH-Wert und einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Cs^+ -Ionen, ist dies ein weiterer Hinweis dafür, daß *AtKC1* für einen "stillen" Kaliumkanal kodiert.

Unter den pflanzlichen *Shaker*-ähnlichen Kaliumkanälen zeigt die K^+ -Kanal- α -Untereinheit KDC1 aus *Daucus carota* mit über 60 % identischen Aminosäuren die größte Ähnlichkeit zu AtKC1 und bildet mit AtKC1 eine eigene Unterfamilie (Abb. 1.8). KDC1 wurde in CHO-Zellen exprimiert und vermittelt einen spannungsabhängigen K^+_{in} -Strom unter hyperpolarisierenden Bedingungen (Downey *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, daß *KDC1*-mRNA ausschließlich in Wurzeln, und hier vor allem an Wurzelhaarspitzen lokalisiert ist. Durch Vergleich der elektrophysiologischen Charakteristika schlagen die Autoren vor, daß KDC1 die Hauptkaliumleitfähigkeit in Wurzelhaarprotoplasten ausmacht, jedoch auch andere K^+_{in} -Kanäle beteiligt sein könnten. Die große Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz und der Lokalisation in Wurzeln von AtKC1 zu KDC1 läßt vergleichbare Funktionen vermuten. Die elektrophysiologische Analyse von AtKC1 in verschiedenen Expressionssystemen und von KDC1 in COS-Zellen belegen jedoch die unterschiedlichen Funktionen. KDC1 mag in dieser Hinsicht eher die Funktion der AKT1- α -Untereinheit widerspiegeln, obwohl deutliche Unterschiede in der Kanalregulation, wie beispielsweise durch den pH-Wert bestehen (Horeau und Thibaud, 1998).

Phänotypische Untersuchungen an der *Atkc1-f-knockout*-Mutante. Für die phänotypische Analyse der *Atkc1-f*-Mutanten wurden, nach Kreuzung von *Atkc1-f*- mit Columbia-Wildtyp-Pflanzen, Nachkommen der F_2 -Generation untersucht. Diese waren dann entweder homozygot für den *footprint* (*Atkc1-f*-Pflanzen) oder, bei vergleichbarer Verteilung von *En-1*-Insertionen und anderer *footprints*, homozygot für das *AtKCI*-Wildtyp-Allel (Kontroll-Pflanzen). Zur Analyse der Nullmutantenlinien wurden unterschiedliche Lichtverhältnisse und Nährmedien verwendet; zwischen *Atkc1-f*-, den Kontroll- und Columbia-Wildtyp-Pflanzen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Phänotyp beobachtet werden, der auf die Ausschaltung des *AtKCI*-Gens zurückgeht.

Durch *knockout* der AKT1- α -Untereinheit konnte bei spezifischen Mineralzusammensetzungen des Nährmediums ($[K^+] = 100 \mu M$, $[NH_4^+] = 2 mM$ und $pH = 5,7$) ein deutlicher Unterschied im Wachstum zwischen Wildtyp- und *akt1-1*-Pflanzen festgestellt werden (Hirsch *et al.*, 1998). Es wurde geschlossen, daß bei dieser Ionenzusammensetzung bestimmte weitere K^+ -Aufnahmesysteme von Wurzelzellen nicht aktiv sind (Spalding *et al.*, 1999). In Wurzelhaarprotoplasten von *Atkc1-f*-Pflanzen konnte nun durch elektrophysiologische Messungen festgestellt werden, daß eine $[Rb^+]$ von 1 mM im Badmedium den K^+_{in} -Strom vollständig unterdrückte, während in entsprechenden Kontroll-Protoplasten dieser Strom nur um etwa 20 bis 30 % reduziert war. Wird angenommen, daß in Wurzelepidermiszellen und Wurzelhaaren vor allem die beiden K^+ -Kanäle AKT1 und *AtKC1* exprimiert sind (Reintanz *et al.*, 2002), so hätte unter den von Hirsch *et al.* (1998) beschriebenen Bedingungen und unter Zusatz von 1 mM Rb^+ genau dieser K^+_{in} -Strom unterdrückt werden und in *Atkc1-f*-Pflanzen ein entsprechend deutlicher Wachstumsphänotyp sichtbar werden sollen, was aber nicht gezeigt werden konnte. Hierfür kommen vor allem folgende Möglichkeiten in Betracht:

- Die Ausschaltung der *AtKC1*-Funktion verursacht keine beobachtbaren phänotypischen Änderungen auf makroskopischer Ebene. Die Aufnahme von Kalium aus dem Boden ist für die Pflanze eine essentielle Aufgabe, zumal die $[K^+]$ im umgebenden Medium stark variieren kann. Durch verschiedene Kaliumaufnahmestudien konnte gezeigt werden, daß mindestens 2 Mechanismen für diesen Import verantwortlich sind und die Transportsysteme sich in ihren Funktionen teilweise ergänzen und überlagern. Durch diese Redundanz auf Protein-Ebene ist die Kaliumaufnahme aus dem Boden weitgehend gesichert: In den meisten bekannten *knockouts* von K^+ -Kanal- α -Untereinheiten, SKOR (Gaymard *et al.*, 1998), AKT2

(Dennison *et al.*, 2001) und KAT1 (Szyroki *et al.*, 2001), treten keine beobachtbaren phänotypischen Änderungen auf. Die Pflanze kann auch durch andere Osmotika eine Reduktion im K^+ -Gehalt kompensieren, sei es durch Erhöhung der Konzentration anderer Mineralionen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} und Na^+ in der *skor-1*-Mutante (Gaymard *et al.*, 1998) oder durch die Bereitstellung von Saccharose bei der Schließzellbewegung (Talbot und Zeiger, 1998).

- Die Ausschaltung der AtKC1-Funktion verursacht geringe phänotypische Änderungen. Diese können aber nicht mit dem AtKC1-*knockout* korreliert werden, weil große Wachstumsunterschiede innerhalb der einzelnen *Atkc1-f*- und Kontrolllinien bestehen, die über die natürlichen Abweichungen hinausgehen. Dies rührt von den nicht-charakterisierten *En-1*-Transposons und *footprints* her, die zum Teil in der untersuchten F_2 -Population segregieren. Darüber hinaus sind die *En-1*-Transposons weiterhin als Mutagene aktiv.
- Um bei der elektrophysiologischen Analyse der Pflanzenzelle einen Zugang der Elektrode zur Plasmamembran zu ermöglichen, wird die Zellwand durch enzymatischen Verdau abgebaut. Es möglich, daß Signalketten in der Zelle durch den Zellwandabbau aktiviert oder gehemmt wurden und es so zu einem Abschalten oder Aktivieren von Ionenkanälen, z. B. über Phosphorylierungsergebnisse, kommt. Es ist daher möglich, daß die gefundenen elektrophysiologischen Eigenschaften von *Atkc1-f* an Protoplasten stärker ausgeprägt sind als es eigentlich *in planta* der Fall ist und daher die phänotypischen Änderungen minimal sind. Es konnte z. B. gezeigt werden, daß Schließzellprotoplasten von KAT1-*knockout*-Mutanten keinen K^+ _{in}-Strom unter hyperpolarisierenden Bedingungen zeigten, dieser Strom jedoch an intakten Schließzellen durch *impalement*-Messungen nachzuweisen war (Szyroki *et al.*, 2001)

AtKC1 ist als “stille” a-Untereinheit bei der Kaliumaufnahme in die Wurzel beteiligt.

Die Kaliumaufnahme aus dem Boden in die Wurzel findet zunächst symplastisch und apoplastisch statt. Messungen an Maiswurzeln zeigten, daß die Kalium-Aufnahme vor allem bei hohen K^+ -Konzentrationen symplastisch erfolgt (Kochian und Lucas, 1983). Kalium kann parallel dazu innerhalb des kortikalen Apoplasten bis zur Endodermis diffundieren. Der CASPARI-Streifen verhindert die weitere passive Diffusion durch die Zellwand. K^+ gelangt

allein symplastisch in das Xylemparenchym (Clarkson, 1993) und wird von diesem gerichtet in den stelaren Apoplasten abgegeben.

Durch Messungen mit radioaktivem Kalium ($^{42}\text{K}^+$) konnte gezeigt werden, daß die Kaliumaufnahme in Gerstenwurzeln einer zweiphasigen Kinetik folgt (Welch und Epstein, 1968; Epstein *et al.*, 1963): Ein hochaffiner Mechanismus reguliert die Aufnahme bei niedrigen Konzentrationen; bei höheren Kaliumkonzentrationen tritt ein zweiter, niedrigaffiner Mechanismus in Kraft. Beide Systeme zeigen nach Michaelis-Menten-Kinetik Sättigungsverhalten. Kochian und Lucas (1982) beschrieben die K^+ -Aufnahme isolierter Maiswurzeln im μM -Bereich ebenfalls durch Sättigungsverhalten, im mM -Bereich aber durch eine lineare Kinetik erster Ordnung. Diese lineare Komponente, die durch den Kaliumkanal-Inhibitor TEA unterdrückt werden kann, wurde einem kanalvermittelten Transport zugeschrieben (Kochian *et al.*, 1985). Durch Anwendung der *patch clamp*-Technik auf protoplastierte Wurzelepidermiszellen aus *A. thaliana* wurden Hinweise erbracht, daß das hochaffine System mittels K^+/H^+ -Symporter (Maathuis und Sanders, 1994; Schachtmann und Schröder, 1994) oder K^+/Na^+ -Symporter (Kochian und Lucas, 1993, Maathuis und Sanders, 1993) arbeitet, wohingegen die niedrigaffine Aufnahme durch K^+ -Kanal-vermittelten Einstrom stattfindet (Maathuis und Sanders, 1995, Smart *et al.*, 1996).

Als vorherrschende, einwärtsrektifizierende K^+ -Kanal- α -Untereinheiten in Wurzeln wurden AKT1 (Lagarde *et al.*, 1996) und AtKC1 (Reintanz *et al.*, 2002) identifiziert. Beide zeigen in GUS-Analysen höchste Promotor-Aktivität in Wurzelhaaren und Endodermiszellen. Durch RT-PCR konnte gezeigt werden, daß das Verhältnis der Transkriptmenge sowohl in Wurzelhaaren als auch in der Endodermis bei etwa 1:2 (AKT1:AtKC1) liegt (Reintanz *et al.*, 2002). Dies kann darauf hin deuten, daß AKT1 und AtKC1 einen heteromeren Kanal in der Plasmamembran von solchen Zellen bilden, die hauptsächlich an der Kaliumaufnahme aus dem Boden beteiligt sind.

Das theoretische Konzentrationsminimum, bis zu welchem K^+ durch passiven Transport aus dem Boden aufgenommen werden kann, wird bestimmt durch das Membranpotential E_R . Für Wurzelzellen aus *A. thaliana* liegt dies bei etwa -220 mV (Spalding *et al.*, 1999). Wird eine cytosolische Kaliumkonzentration von etwa 100 mM angenommen, ist ein Kanal-vermittelter, also passiver Transport von K^+ bei Konzentration bis zu 15 μM möglich. Damit könnte das AKT1/AtKC1-Heteromer für einen Teil der hochaffinen Kaliumaufnahme in Wurzeln verantwortlich sein.

4.2 Arbeiten zur Lokalisation und Funktion von KAT2

4.2.1 Lokalisation von KAT2

Um die Expressionsorte von KAT2 zu charakterisieren, wurde die KAT2-Promotoraktivität durch GUS-Analyse untersucht. Die entsprechenden Pflanzen standen zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung und eine erste Charakterisierung zeigte GUS-Expression im Zentralzylinder von Wurzeln und Hypokotyl und im vaskulären Gewebe von Blättern (Spoormaker, 1998). Damit kann eine Funktion von KAT2 bei der Be- oder Entladung des Leitungssaftes vermutet werden. Für die weiteren Analysen wurde die GUS-Expression während bestimmter Entwicklungsstadien untersucht.

Analyse der KAT2-Promotoraktivität. Die KAT2-Promotoraktivität wurde mittels Promotor-GUS-Pflanzenlinien in Blüten und der Keimlingsentwicklung analysiert. Dabei wurden folgende Beobachtungen gemacht: KAT2-Transkription zeigte sich in der gerade gekeimten Pflanze in allen Geweben, wobei die Färbung der Wurzel während der nachfolgenden Tage graduell zurückgeht. Die Promotoraktivität wurde in der Blütenentwicklung in Narbe, Griffel und dem apikalen Bereich des Ovars detektiert. Nach Abreifung der Schote wurde eine intensive Färbung der Abscissionszone beobachtet.

Damit können zusätzlich zur Funktion von KAT2 in den Leitungsbahnen der Pflanze weitere KAT2-vermittelte Prozesse vermutet werden. In der Keimlingsentwicklung ist, kurz nach Aufhebung der Samenruhe, eine schnelle Verteilung der gespeicherten Mineralien notwendig, um eine erfolgreiche Keimung zu ermöglichen. Eine Funktion von KAT2 hierbei ist denkbar. Im Zuge der Blütenentwicklung könnte KAT2 vor allem bei schnellen Wachstumsprozessen des Karpell beteiligt sein.

Die große Verbreitung von KAT2 in der Pflanze und die entwicklungsspezifische Expression legt eine unterschiedliche Regulation der KAT2-Aktivität in verschiedenen Zellen nahe. Daher wurde untersucht, ob die KAT2-Expression durch das Phytohormon Auxin beeinflusst wird. Isolierte Hypokotyle von etiolierten und licht-gewachsenen Keimlingen wurden dazu mit IAA behandelt. Es konnte jedoch keine Änderung der GUS-Expression nachgewiesen werden. Es kann also vermutet werden, daß die Regulation der KAT2-Kanalaktivität im vaskulären Gewebe vor allem posttranslational erfolgt.

Vergleich der KAT2-Lokalisation mit anderen Arbeiten. Zur Untersuchung der Zellspezifität eines Promotors werden häufig Promotor-Reporter-gen-Fusionen verwendet. Ein solches Konstrukt wird in einem geeigneten Transfervektor durch *Agrobacterium*-vermittelte Transformation in das Genom von Pflanzen integriert. Das in dieser Arbeit verwendete *uidA*-Gen, welches für β -Glucuronidase kodiert, hydrolysiert das Vorläufermolekül X-Gluc, welches nach Oxidation zu Indigo dimerisiert. Einige Artefakte wurden im Zusammenhang mit dieser Methode berichtet (Übersicht in Martin *et al.*, 1992): Die GUS-Expression erfolgt auch durch Agrobakterien, die für die Herstellung der transgenen Pflanzen verwendet werden; auch nach mehreren Generationen lassen sich diese Bakterien noch an, bzw. in den Pflanzen nachweisen. Die Farbreaktion wird zudem auch durch endogene β -Glucuronidasen hervorgerufen. Aus diesem Grund wurde für die vorliegenden Studien ein *uidA*/Intron-Derivat verwendet, welches die Expression durch Agrobakterien ausschließt (Vancanneyt *et al.*, 1990). Zusätzlich wurden alle Farbreaktionen bei einem pH-Wert von 7,7 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sind die bekannten pflanzlichen β -Glucuronidasen nicht aktiv.

Zwischen den Färbungen der unterschiedlichen KAT2-Promotor-GUS-Linien (Spoormaker, 1998; Pilot *et al.*, 2001) bestehen einige Unterschiede (Zab. 4.1), die im Folgenden mit bekannten Daten durch Northernblot- und RT-PCR-Analysen verglichen werden.

KAT2 Expressionsorte		
nach dieser Arbeit, bzw. nach Spoormaker (1998)	nach Pilot <i>et al.</i> (2001)	nach Northernblot- (I), bzw. nach RT-PCR-Analysen (II)
Zentralzylinder der Hauptwurzel, z. T. Seitenwurzeln	keine Färbung in Wurzeln	I:kein Signal in Wurzeln (1, 2, 3)
Zentralzylinder des Hypokotyls	im Hypokotyl nur die Schließzellen	keine Angaben
Hauptadern des vaskulären Systems in Blättern; nicht in Schließzellen	in sich entwickelnden Blättern in allen Zellen; in entwickelten Blättern v. a. in Schließzellen und verzweigten Blattadern (hier im Phloem, nicht im Xylemparenchym)	I: Blätter (1); Rosetten- und Stengelblätter (2, 3) II: Schließzellen (4)
Blüten und sich entwickelnde Schoten	kein Signal in Blüten	I: Blüten und sich entwickelnde Schoten (2)

Tabelle 4.1. Zusammenfassung der Unterschiede in den Expressionsdaten von KAT2 durch Reporter-GUS-, Northernblot- und RT-PCR-Analysen. Die Referenzen der Northernblot- und RT-PCR-Daten sind: (1) Butt *et al.*, 1997; (2) Lacombe *et al.*, 2000; (3) Pilot *et al.*, 2001; (4) Szyroki *et al.*, 2001.

In der kürzlich veröffentlichten *KAT2*-cDNA-Sequenz schlugen Pilot *et al.* (2001) ein alternatives Start-Codon vor, das zu einer Verlängerung des *KAT2*-Proteins um 11 Aminosäuren führt (s. dazu 4.2.2). Im Promotor-Reporter-Konstrukt, welches in dieser Arbeit verwendet wurde (Spoormaker, 1998), wurde das ursprünglich angenommene Start-Codon AUG zu AUC mutiert (s. Abb. 4.1). Da die genaue Vektor-Sequenz unbekannt war, sollte dadurch eine Verschiebung des offenen Leserasters des *uidA*-Gens vermieden werden. Aufgrund der Unklarheit des Translationsstartes wurde das Promotor-Reporter-Konstrukt sequenziert. Die Analyse der Sequenz ergab, daß bei einem Translationsstart am ersten AUG-Codon das offene Leseraster von *uidA* erhalten bleibt, wobei 24 Aminosäuren N-terminal des GUS-Proteins zusätzlich translatiert werden. Auch das zweite, mutierte Start-Codon ist im Leseraster (s. Abb. 4.1).

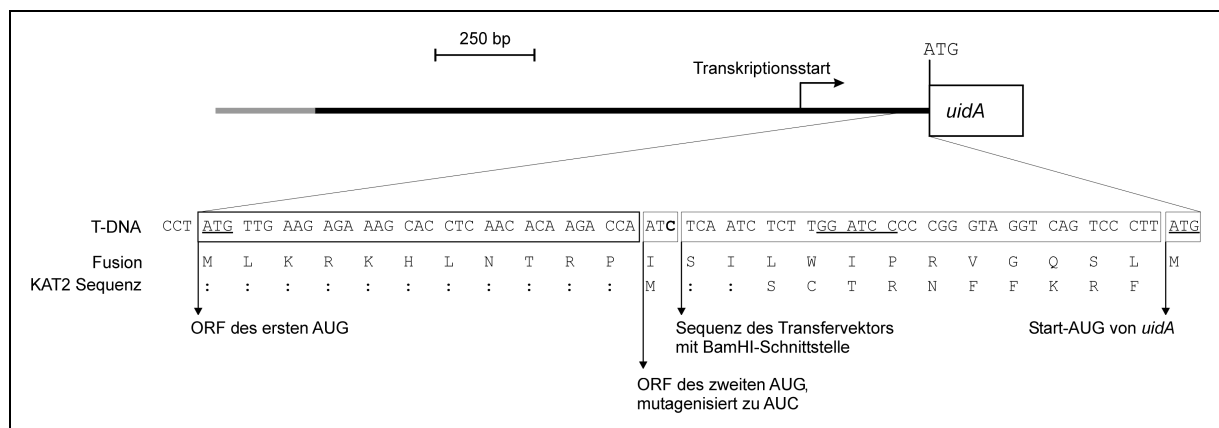


Abbildung 4.1. Schematische Darstellung des *KAT2*-Promotor-*uidA*-Fusionskonstruktes. Im oberen Teil ist der gewählte Promotorbereich als schwarzer Balken dargestellt (Spoormaker, 1998) und als grauer Balken der zusätzliche 5'-Bereich von etwa 250 bp (Pilot *et al.*, 2001). Der durch RACE-Analyse (Pilot *et al.*, 2001) identifizierte Transkriptionsstart ist durch einen Pfeil angezeigt. Das Start-Codon des *uidA*-Gens (Kasten) ist markiert. Unterhalb des Schemas ist ein Teil der Sequenz im Detail dargestellt: "T-DNA" bezeichnet das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt, "Fusion" die aus der oberen DNA- abgeleitete Aminosäuresequenz und "KAT2-Sequenz" die von Pilot *et al.* (2001) veröffentlichte Sequenz, wobei identische Aminosäuren durch einen Doppelpunkt (:) dargestellt sind.

Der gewählte Promotorbereich im Fusionskonstrukt PKAT2::GUS umschloß etwa 1,55 kb (Spoormaker, 1998). Das von Pilot *et al.* (2001) verwendete Konstrukt umfaßt insgesamt 1,8 kb, wobei im 3'-Terminus der Promotorbereich bis direkt vor das erste AUG-Codon eingesetzt wurde. Wird das zweite AUG-Codon als möglicher Translationsstart erkannt, fehlen in diesem Konstrukt demnach 33 bp des regulatorischen Bereiches.

Die Unterschiede in den Färbungen zwischen transgenen Pflanzen dieser Arbeit und jenen von Pilot *et al.* (2001) müssen zurückgeführt werden auf den entfernten 5'-Bereich und den unmittelbar vor *uidA* gelegenen 3'-Bereich. Der Insertionsort der T-DNA beeinflusst vor allem die Expressionsstärke als das qualitative Unterschiede in der GUS-Färbung auftreten. Beide Konstrukte wurden zudem in *A. thaliana* Pflanzen des Ökotyps Columbia transformiert.

Die teilweise unterschiedliche Datenlage zwischen den beschriebenen GUS-Analysen und den Ergebnissen der Northernblot- und RT-PCR-Analysen (s. Tabelle 4.1) könnte auch durch die verschiedenen Kulturbedingungen erklärt werden: Für die Northernblot-Analyse werden größere Mengen Wurzelgewebe benötigt, die in Flüssigkultur unter ständiger Rotation angezogen werden (Gaymard *et al.*, 1998). Demgegenüber wurden die Pflanzen für qualitative GUS-Studien auf festem ARA-Medium kultiviert.

Da sich beide Ergebnisse der GUS-Färbungen zum Teil durch RT-PCR- und Northernblot-Analysen bestätigen lassen, kann eine abschließende Aussage zur Lokalisation möglicherweise nur durch *in situ*-Hybridisierung und *whole mount*-Immunfluoreszenz machen lassen; allerdings könnte die offensichtlich niedrige Expressionsrate von *KAT2* dabei problematisch sein.

4.2.2 Funktion von *KAT2*

Nach Durchmusterung der *En-1*- und verschiedener T-DNA-Insertionsmutantenbibliotheken konnte keine *KAT2-knockout*-Mutante isoliert werden. Dies könnte auf eine wichtige Funktion von *KAT2* hindeuten, deren Ausschaltung für die Pflanze möglicherweise lethal ist oder zu Sterilität führt. Zu Beginn dieser Arbeit lag nur ein partieller *KAT2*-Klon vor (Butt *et al.*, 1997). Daher sollte die vollständige cDNA isoliert werden, um *KAT2* funktionell charakterisieren zu können.

Klonierung und Analyse der *KAT2*-cDNA. Die vollständige *KAT2*-cDNA konnte nicht durch RT-PCR amplifiziert werden, so daß vermutet wurde, daß der *KAT2*-Transkriptspiegel sehr niedrig lag. Daher wurde die genomische *KAT2*-DNA, nach Klonierung in den Pflanzentransformationsvektor pVKH-35S-pA1 (Reintanz, 1997), in das *A. thaliana*-Genom integriert, so daß *KAT2* unter der Kontrolle des konstitutiven *CaMV* 35S-Promotors

transkribiert wurde. Durch Northernblot-Analyse konnte in den den meisten transgenen Pflanzenlinien eine deutlich erhöhte *KAT2*-mRNA-Menge nachgewiesen werden. Auf mRNA-Isolaten dieser Pflanzen konnte durch RT-PCR die vollständige *KAT2*-cDNA isoliert werden.

Der klonierte Bereich des *KAT2*-Gens wurde nach 2 Kriterien ausgewählt: Der hohe Ähnlichkeit von *KAT2* zu *KAT1*, besonders im N-terminalen Bereich, nach Analyse der genomischen DNA durch Datenbanken zur cDNA-Vorhersage (MIPS *Arabidopsis thaliana* Datenbank).

In den Northernblot-Analyse auf mRNA-Isolaten der *KAT2*-übertranskribierenden Pflanzenlinien wurden neben dem Hauptsignal bei 2,4 kb mehrere distinkte Nebenbanden identifiziert, bis zu einer Größe von etwa 1 kb. Diese Nebenprodukte sind wahrscheinlich im 3'-Bereich verkürzte mRNAs, welche durch falsches oder ungenaues Spleißen entstanden sind. Eine mögliche Erklärung dieser unvollständigen RNA-Produkte ist die deutlich gesteigerte Menge an *KAT2*-Transkript, welche zu ungenauer, bzw. fehlerhafter Prozessierung führte. Die verkürzten RNAs hatten im nachfolgenden RT-PCR-Experiment jedoch keinen Einfluß, d. h. es wurden nur vollständige cDNA-Klone isoliert.

Keine der übertranskribierenden Pflanzen zeigte Änderungen des Phänotyps. Es kann also vermutet werden, daß die Regulation der *KAT2*-Expression eher posttranslationell erfolgt.

Vergleich der *KAT2*-cDNA mit anderen Arbeiten. In der kürzlich veröffentlichten *KAT2*-cDNA-Sequenz (Pilot *et al.*, 2001) wurde ein um 11 Aminosäuren verlängerter N-Terminus vorgeschlagen. Der durch RACE-Analyse isolierte 5'-Bereich der *KAT2*-mRNA weist einen ungewöhnlich ausgedehnten, etwa 450 bp langen, nicht translatierten Bereich (5'-UTR) auf. 4 AUG-Startcodons werden im jeweiligen Leseraster terminiert durch UAA-Stopcodons (uORF, untranslated Open Reading Frame). Das erste nicht terminierte Startcodon wurde hier als Translationsstart angenommen.

Zwar ist mit einiger Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß nach dem *scanning*-Model das Ribosom die Translation an dem dem 5'-Ende naheliegendsten AUG-Codon beginnt. Abweichungen von dieser ersten AUG-Regel, wonach das Ribosom ungenau durchmustert, die Translation reinitiiert oder direkt intern initiiert, sind beschrieben worden (Übersicht in Kozak, 1999). Demnach ist der das AUG-Codon umgebende Basenkontext für den

Translationsstart mitentscheidend. Die vor allem für Vertebraten aufgestellte, günstigste Konsensussequenz CCPuCC AUG G (Kozak, 1987) wurde von Joshi (1987) auf den pflanzlichen Bereich übertragen und für Mono- und Dikotyledonen spezifiziert (Joshi *et al.*, 1997). Demnach ergibt sich für Dikotyledonen eine optimale Konsensussequenz für die Translationsinitiation aA(A/C)a AUG GC, wobei vor allem Adenin an Position -3 und Guanin an Position +4 hochkonserviert sind.

	-3	+4
diese Arbeit	AGA CCA <u>AUG</u> UCA	
Pilot	AAC CUU <u>AUG</u> UUG	
optimaler Konsensus	a A ^A _C a <u>AUG</u> GC	

Abbildung 4.2. Dargestellt sind die Sequenzen um das putative Translationsinitiations-Codon dieser Arbeit ("diese Arbeit") und der von Pilot *et al.* (2001) veröffentlichten ("Pilot"). Darunter ist die von Joshi *et al.* (1997) publizierte Sequenz des wahrscheinlichsten Translationsstarts ("optimaler Konsensus"). Die zu diesem Konsensus identischen Nukleotide sind fett dargestellt. Das Start-Codon ist unterstrichen. Die geringer konservierten Nukleotide sind in Kleinbuchstaben dargestellt.

Auch wenn die in dieser Arbeit beschriebene Sequenz in den hochkonservierten Positionen -3 und +4 von der optimalen Sequenz abweichen, zeigt sie doch eine größere Ähnlichkeit zur Konsensussequenz als die von Pilot *et al.* (2001) publizierte. Ebenso ist denkbar, daß beide KAT2-Proteinformen in der Pflanze vorliegen. Nur eine genauere Analyse auf Proteinebene kann diese Fragestellung endgültig beantworten.

Eine vergleichbare Problematik stellte sich mit der Identifikation und Klonierung der K⁺-Kanal-cDNAs AKT2 (Cao *et al.*, 1995b) und AKT3 (Ketchum und Slayman, 1996). AKT2 und AKT3 werden von demselben Gen kodiert und sind bis auf 15 zusätzliche, N-terminale Aminosäuren in AKT2 identisch. Lacombe *et al.* (2000) identifizierte durch RACE-Analyse eine etwa 70 bp lange 5'-UTR und wies dem ersten Startcodon (AKT2) aufgrund des günstigeren AUG-Kontextes die Funktion der Translationsinitiation zu.

Elektrophysiologische Untersuchungen an infizierten Sf9-Zellen. Nach Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Viren zur Expression von KAT2, bzw. KAT1, konnte gezeigt werden, daß KAT2 eine zu KAT1 ähnliche Strom-Spannungs-Charakteristik aufweist, dabei aber unter hyperpolarisierenden Bedingungen schneller aktiviert, also in den leitenden Zustand übergehen und unter depolarisierenden Bedingungen schneller deaktiviert.

Damit konnte die Funktion von KAT2 als Kaliumkanal in Sf9-Zellen gezeigt werden. Für die weitere funktionelle Analyse wurden *X. laevis* Oozyten verwendet, um durch die größeren Ströme eine genauere Messung zu erreichen und um eine bessere Vergleichbarkeit mit bereits publizierten Daten zu gewährleisten.

Elektrophysiologische Untersuchungen an *X. laevis* Oozyten. Nach Injektion von KAT2-cRNA in *X. laevis* Oozyten konnte der homomere KAT2-Kanal elektrophysiologisch charakterisiert werden. KAT2 vermittelt einen spannungsabhängigen K^+ -Einstrom bei Membranpotentialen negativer als -100 mV. Die relativen Permeabilitäten monovalenter Kationen folgen der Selektivitätssequenz $K^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Na^+ \sim Li^+$, die typisch für einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle ist, wie z. B. der K^+ -Einwärtsgleichrichter in der Plasmamembran von *V. faba* Schließzellen (Schroeder *et al.*, 1994). KAT2 wird durch Protonen reguliert und durch Cs^+ in einer spannungsabhängigen Weise blockiert.

Eine elektrophysiologische Analyse von KAT2 in *X. laevis* Oozyten wurde auch von Pilot *et al.* (2001) vorgelegt. Die publizierte KAT2-cDNA und das daraus abgeleitete Protein (zur Vereinfachung hier als KAT2^P bezeichnet) ist um 11 Aminosäuren länger als das in dieser Arbeit beschriebene Protein; mögliche Gründe dafür wurden diskutiert. KAT2^P und KAT2 zeigen in Öffnungskinetik, Selektivitätsverhalten und extrazellulärer pH-Regulation ein nahezu gleiches Verhalten.

Daraus kann gefolgert werden, daß die zusätzlichen 11 Aminosäuren im KAT2^P-Protein keine deutlichen Änderungen in der elektrophysiologischen Charakteristik hervorrufen.

Physiologische Bedeutung der Kaliumkanal- α -Untereinheit KAT2. Neben dem spannungsabhängigen Schaltverhalten von K^+ -Kanälen ist die Regulation der Kaliumkanalaktivität durch die extrazelluläre und cytosolische Protonenkonzentration

besonders wichtig. pH-Änderungen haben in unterschiedlichen Geweben verschiedene Wirkungen und H^+ wird als Botenstoff für so unterschiedliche Prozesse wie Längenwachstum oder Schließzellbewegung diskutiert (Übersicht in Felle, 2001). Häufig sind in diese Prozesse Kaliumkanäle involviert, deren Aktivität durch Protonen moduliert wird. Dadurch kann ein Ein- oder Ausstrom von Kalium zusätzlich zur Membranspannung durch Änderung des pH-Wertes reguliert werden.

Auxin z. B. induziert eine H^+ -ATPase-Aktivität in der Plasmamembran, was zu einer Ansäuerung des Apoplasten und einer Hyperpolarisation führt. In der Folge kommt es zu einer Aktivierung von K^+ _{in}-Kanälen. Aus Maiskoleoptilen konnte die Kaliumkanal- α -Untereinheit ZMK1 isoliert werden, die wahrscheinlich den K^+ -Einstrom während Auxin-induzierten Wachstums vermittelt (Phillipar *et al.*, 1999). ZMK1 zeigt eine vergleichbare pH-Regulation wie die *in planta* gemessenen K^+ -Kanäle. In der Tat kann Auxin-induziertes Wachstum durch typische K^+ -Kanalblocker wie TEA, Ba^{2+} oder Ca^{2+} unterbunden werden.

Verschiedene Stimuli wie Auxin, Licht oder verminderter CO_2 -Partialdruck führen zu einer Öffnung der Stomata. Dem geht eine Verminderung des apoplastischen und cytosolischen pH-Wertes voraus, was in der Folge zu einem K^+ -Einstrom und damit der Erhöhung des Schließzellturgors führt. Die Schließzell-Kaliumkanäle KAT1 und KST1 zeigen eine pH-Abhängigkeit, die derjenigen *in planta* qualitativ entspricht (Brüggemann *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß eine Verminderung des extra- oder intrazellulären pH-Wertes den KAT2-vermittelten Strom erhöht. Aus den Daten zur Lokalisierung von KAT2 wird vermutet, daß KAT2 an unterschiedlichen Prozessen in der Pflanze beteiligt ist, die möglicherweise durch die Protonenkonzentration reguliert werden. Die Expression im vaskulären Gewebe deutet auf eine Funktion bei der Be- oder Entladung der Leitgefäße hin, also im Langstreckentransport von Kalium in der Pflanze. Des weiteren ist es möglich, daß KAT2 bei der Stomaöffnung und während der Elongation des Karpells beteiligt ist.

Diese postulierten Funktionen von KAT2 in der Physiologie der Pflanze können vor allem durch eine Mutantenlinie, in welcher das *KAT2*-Gen ausgeschaltet ist, überprüft werden. Der Verlust der KAT2-Funktion wird möglicherweise diese vielfältigen Aufgaben illustrieren. Daher ist der Ausgangspunkt zukünftiger Arbeiten zur Funktion von KAT2 die Isolierung einer *KAT2-knockout*-Mutante.

4.3 Ausblick

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Analyse deuten darauf hin, daß AtKC1 als Homomer ein “stiller” K^+ -Kanal ist und als Heteromer modulierende Eigenschaften auf andere K^+ -Kanäle wie etwa AKT1 zeigt.

Um diese Wechselwirkung zwischen zwei integralen Membranproteinen nachzuweisen, ist das Hefe-2-Hybrid-System weniger geeignet; statt dessen könnte eine Interaktion mit Hilfe des *split ubiquitin*-Systems untersucht werden, da hier auch Wechselwirkungen von Transmembranproteinen nachgewiesen werden können (Johnsson und Varshavsky, 1994).

Die Interaktion von K^+ -Kanälen mit anderen regulatorischen Proteinen wie Kinasen, Phosphatasen, β -Untereinheiten und G-Proteinen ist noch sehr unvollständig und deren Nachweis häufig indirekt. Da diese Proteine meist an die cytoplasmatischen N- und C-Termini des K^+ -Kanals binden, bietet sich zur systematischen Durchmusterung von cDNA-Banken das Hefe-2-Hybrid-System an, wobei nur die hydrophilen Domänen des Kanalproteins eingesetzt werden. Entsprechende Studien, in denen nach putativen Interaktionspartnern gesucht wird, sind derzeit in Arbeit.

Die funktionelle Expression von AtKC1 in *X. laevis* Oozyten, HEK 293-Zellen und Sf9-Zellen gelang bisher nicht. Demgegenüber konnte KDC1, ein K^+ -Kanal-Ortholog aus Karotte, der mit AtKC1 eine Subfamilie bildet, in COS-Zellen funktionell charakterisiert werden (Downey *et al.*, 2000). Weitere Arbeiten zur AtKC1-Funktion sollten die Expression in diesem System zum Gegenstand haben.

Die Beschreibung subtiler Phänotypen von Pflanzen mit multiplen *knockouts*, wie in den *En-1*-mutagenisierten Linien, ist problematisch: Die Analysen des Phänotyps der Atkc1-f-Mutanten waren durch die teilweise beträchtlichen Unterschiede der Schwesterpflanzen aller untersuchter Linien, d. h. sowohl Atkc1-f- als auch die entsprechenden Kontrolllinien, äußerst schwierig. Um eindeutige phänotypische Änderungen beobachten zu können, sollten daher singuläre *knockouts* identifiziert werden. Dazu stehen verschiedene T-DNA-Insertionsmutantenbanken zur Verfügung, die momentan durchmustert werden.

Ähnlich zu den geplanten und begonnenen Arbeiten zur AtKC1-Funktion und -Interaktionsanalyse sollte nach erfolgter Charakterisierung von KAT2 in Sf9-Zellen und *X. laevis* Oozyten ebenso nach Bindungspartnern und Nullmutanten gesucht werden.

Bisher konnte in keiner Mutantenbibliothek eine KAT2-Nullmutante identifiziert werden; dies könnte als möglicher Hinweis gewertet werden, daß die Ausschaltung von KAT2 für die Pflanze lethal ist. Durch die große Homologie von KAT2 zu KAT1, aber auch zu anderen K⁺-Kanälen von *A. thaliana*, bietet sich statt der antisense-Technik die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) an. Dazu werden invertierte Wiederholungen des Promotors des interessierenden Gens transkribiert; diese doppelsträngigen RNA-Intermediate führen zur Methylierung der Promotor-DNA und schlußendlich zum transkriptionellen Gen-*silencing* (Mette *et al.*, 2000, Übersicht in Kooter *et al.*, 1999) Diese Technik könnte, in Verbindung mit der Verwendung eines induzierbaren Systems, Aufschlüsse über die KAT2-Funktion z. B. während der Blütenentwicklung und der Schließzellbewegung geben.

Nachdem alle *Shaker*-ähnlichen K⁺-Kanäle in *A. thaliana* kloniert und nahezu alle elektrophysiologisch charakterisiert sind, werden sich künftige Arbeiten mit der Zusammensetzung und Funktion *in vivo* befassen. Hierfür wird die klassische Genetik und Elektrophysiologie nicht mehr genügen. Bei der Suche nach Interaktionspartnern sowie der Regulierung durch intrazelluläre Effektoren wie pH, Ca²⁺ und Phosphorylierungen werden auch neuere Techniken zum Einsatz kommen müssen, genannt seien hier vor allem fluoreszenztechnische Verfahren wie Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer-Techniken, bildgebende Verfahren der lebenden Zelle und Expressionskartierung auf Proteomebene.

5 Zusammenfassung

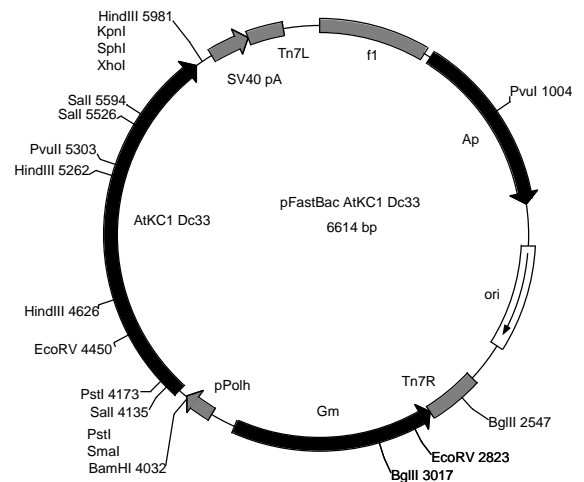
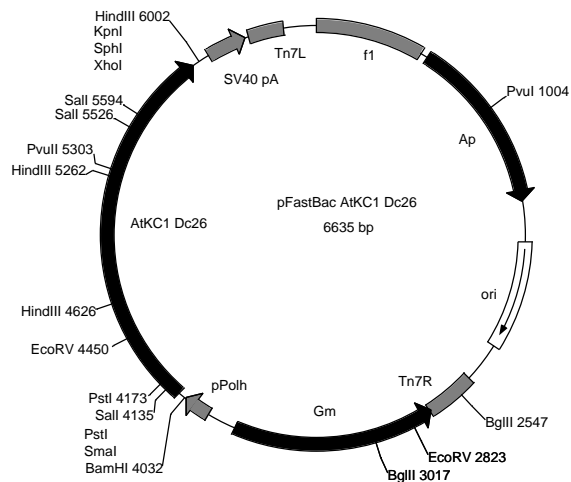
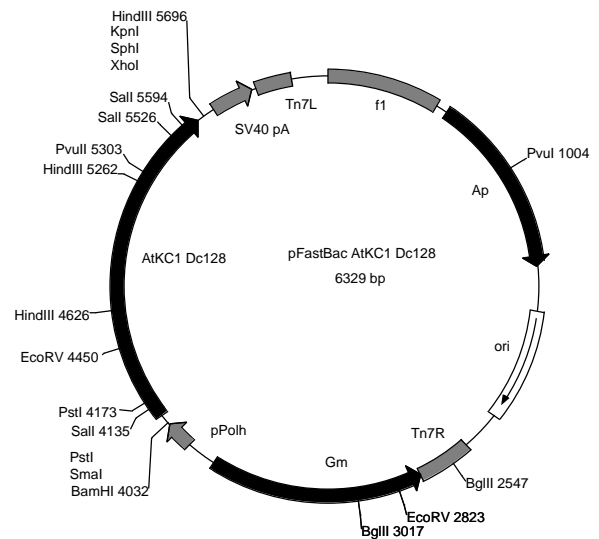
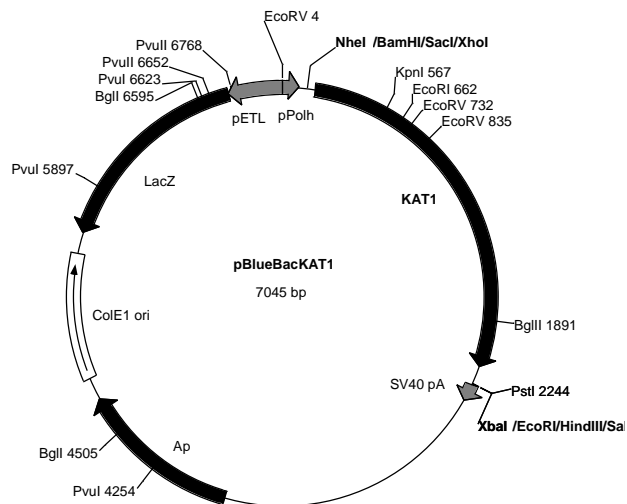
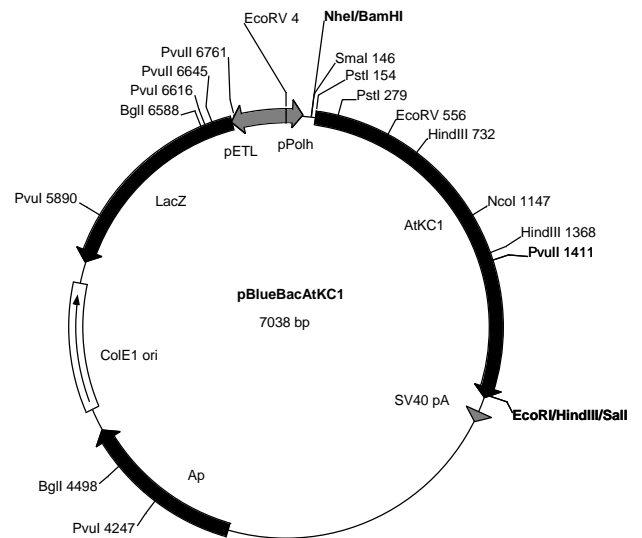
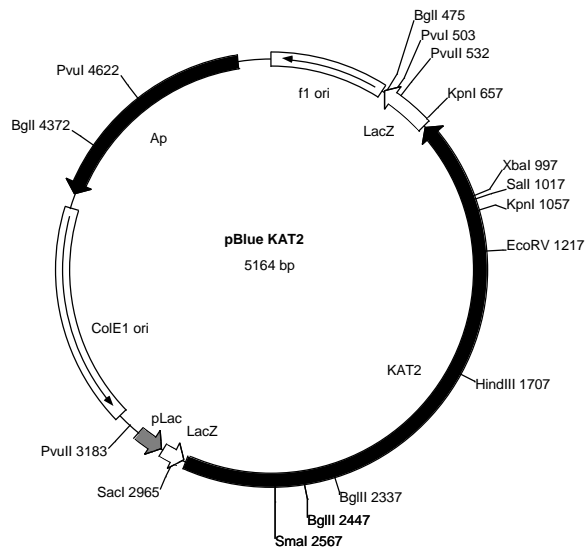
Die vorliegende Arbeit behandelt die Lokalisation und Funktionsanalyse der Kaliumkanal- α -Untereinheiten AtKC1 und KAT2 aus *Arabidopsis thaliana*.

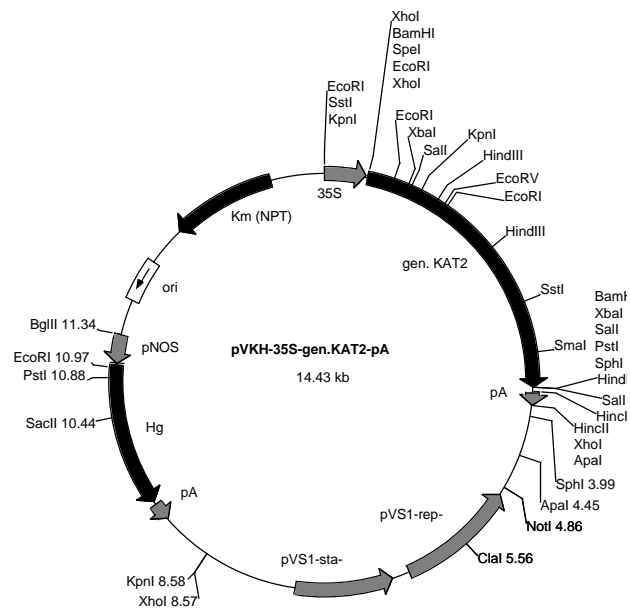
Westernblot-Analysen wiesen AtKC1 ausschließlich in der Plasmamembran-Fraktion nach. Die apparente molekulare Masse von nativem AtKC1 von etwa 76 kDa entspricht der theoretisch vorhergesagten. In heterologen Expressionssystemen (Sf9-Zellen und BY2-Tabaksuspensionszellen) lag AtKC1 ebenso wie verschiedene Deletions- und Fusionskonstrukte ausschließlich im ER vor und konnte daher nicht elektrophysiologisch untersucht werden. Aus einer *En-1*-mutagenisierten Population wurde die *footprint*-Mutante Atkc1-f isoliert, in der die Expression von AtKC1 vollständig unterdrückt war. Es wurden keine phänotypischen Änderungen beobachtet, die auf den AtKC1-*knockout* zurückgeführt werden könnten. Die *patch clamp*-Analyse an Wurzelhaar-Protoplasten von Atkc1-f- im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen ergab eine Änderung der Öffnungskinetik, eine invertierte pH-Abhängigkeit sowie eine Erhöhung der Rb⁺-Sensitivität und die Kanalinhibierung durch Ca²⁺.

Die vollständige KAT2-cDNA wurde aus Pflanzen isoliert, die den genomischen KAT2-Klon unter Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors überexprimierten. Die Expression in Sf9-Zellen und *X. laevis* Oozyten zur elektrophysiologischen Analyse ergab, daß KAT2 für einen spannungsabhängigen, einwärtsgerichtenden Kaliumkanal mit hoher Selektivität für Kalium gegenüber anderen Kationen (K⁺ >> Rb⁺ > NH₄⁺ > Na⁺ ~ Li⁺) kodiert. Der KAT2-vermittelte K⁺-Strom wird durch niedrige extrazelluläre wie cytosolische pH-Werte erhöht und durch Cs⁺ blockiert. Unter Verwendung von Promotor-GUS-Pflanzen konnte die Aktivität des KAT2-Promotors ubiquitär in jungen Keimlingen nachgewiesen werden, wobei die Färbung in der Wurzel mit dem Alter zurückgeht. In Blüten zeigte sich Promotoraktivität in Narbe, Griffel und apikalem Ovar, in der entwickelten Schote nur in der Abscissionszone.

6 Anhang

6.1 Vektorkarten





6.2 Expressionsdaten der 6TM1P-Kaliumkanal- α -Untereinheiten

Kanal	K.O.	Northern/RT-PCR	Promotor::GUS Fusionen
KAT1	+ (1)	N, ? (St, schwach W) (2) N, ? (Rb, Sb, St, Bl und Sch, nicht W) (3) N, ? (Rb, Sb, St, nicht W) (4) RT (B, Bl, nicht W, St) (5) RT (Sz) (1)	3,4 kb, Sz im Hy und Ko (6) ?, Sz des Bs und B, nicht der St (4)
KAT2		N, 2,1 kb (B, nicht W) (5) N, ? (Rb, Sb, St, stark Bl und Sch, nicht W) (3) N, ? (Rb, Sb, St, nicht W) (4) RT (Sz) (1)	1,8 kb, in jungem B alle Zellen, nicht in W; im reifen B: Sz, kleinere Adern (Ph, nicht Xylemparenchym); in Sz des H, St und Bs (4)
AKT1	+ (7, 8)	N, ? (W) (2) N, 2,8 kb (oberidrische Pflanzenteile, W) (9) N, 2,8 kb (stark in W) (10) N, 2,8 kb (Rb, W, nicht in St, Bl) (11) N, ? (stark in W, Rb, Sb, nicht in St, Bl. und Sch) (3) RT (W, St, B, nicht in Bl) (5) RT (Sz) (1)	1,9 kb, in reifen W: Wh, Ep, Co und En; in Erde nicht in Wh und Ep; in B: Hydathoden (Ep, Sz), frühe Blattprimordien (11)
AKT2/ AKT3	+ (12)	N, 2,8 kb (stark in B, nicht in W) (10) N, ? (Hauptadern, nicht Mesophyll) (13) N, ? (Rb, Sb, St, Bl und Sch, nicht W) (3) N, ? (Blütenstengel, Bl, B, St, nicht W) (14) RT (W, B) (3) RT (schwach in Sz) (1)	0,6 kb, in jungen Setzlingen: St, Blütenstiel, B, Sepalen, nicht W, im Hy nur nach Grünfärbung; in B: Ph und Xylemparenchym (14) 1,5 kb, vaskuläres Gewebe von B, Bs, St; Bl (vaskuläres Gewebe von Sepalen, Fruchtknotenfilamente, Stengel sich entwickelnder Sch); B (Ph aller Adern, schwächer in Mesophyll, Ep und Sz) St (Xylemparenchym und Ph) W (Stelares Gewebe und Ph) (3)
SKOR	+ (15)	N, ? (W, nicht in B, St, Bl und Sch) (15) N, ? (W, nicht in Rb, Sb, St, Bl und Sch) (3) RT (nicht in Sz) (1)	1,8 kb, W: Perizykelzellen, Xylemparenchym (15)
GORK		N, ? (St, nicht in W, Rb, Sb, Bl und Sch) (3) RT (St, B, Bl, Sz Protoplasten, nicht in Mesophyllprotoplasten) (16) RT (Sz) (1)	
AtKC1	+ (17)	N, ? (W, nicht Sch, Bl, B, St) (17) N, ? (W, Rb, nicht in Sb, St, Bl und Sch.) (3) RT (Sz) (1)	1,9 kb, W (Wh, Ep, Co, En), Trichome, Hydathoden, Blattprimordien (17)
SPIK	+ (18)	N, ? (Bl und Sch., nicht in W, Rb, Sb, St) (3) N, ? (Bl, nicht in W, Rb, Sb, St) (18) RT (nicht in Sz) (1)	2,5 kb, Pollen aller Entwicklungsstufen, Pollenschläuche (18)
AKT6		N, ? (Bl und Sch., nicht in W, Rb, Sb, St) (3) RT (nicht in Sz) (1)	

Tabelle 6.1. Übersicht über die Expressionsdaten der bekannten *Shaker*-ähnlichen K^+ -Kanal- α -Untereinheiten. Die Tabelle ist untergliedert in die Spalten "Kanal" (die identifizierten Shaker-ähnlichen Kaliumkanäle), "K.O." (die identifizierten und beschriebenen *knockout*-Mutanten) "Northern/RT-PCR" (Northernblot- und RT-PCR-Analysen zur gewebespezifischen Transkription) und "Promotor::GUS Fusionen" (Analyse der Promotoraktivität durch Promotor-Reportergen-Fusionslinien). In der Spalte "Northern/RT-PCR" steht: N: Northernblot-Analyse, die Zahl gibt die Länge des detektierten Transkriptes an. Ein Fragezeichen bedeutet, daß keine Angaben gemacht wurden; RT: RT-PCR-Analyse. In der Spalte "Promotor::GUS Fusionen" gibt die Zahl die Länge des eingesetzten Promotor-Bereiches an. Ein Fragezeichen bedeutet, daß keine Angaben gemacht wurden. Die Gewebe, bzw. Organe wurden folgendermaßen abgekürzt: B: Blatt; Bl: Blüte; Bs: Blattstiel; Co: Cortex; En: Endodermis; Ep: Epidermis; Hy: Hypokotyl; Ko: Kotyledone; Ph: Phloem; Rb: Rosettenblatt; Sb: Stengelblatt; Sch: Schote; St: Stengel; Sz: Schließzelle; W: Wurzel; Wh: Wurzelhaar; Xy: Xylem (1) Szyroki *et al.*, 2000; (2) Kochian *et al.*, 1993; (3) Lacombe *et al.*, 2000; (4) Pilot *et al.*, 2001; (5) Butt *et al.*, 1997; (6) Nakamura *et al.*, 1995; (7) Hirsch *et al.*, 1998; (8) Spalding *et al.*, 1999; (9) Basset *et al.*, 1995; (10) Cao *et al.*, 1995b; (11) Lagarde *et al.*, 1996; (12) Dennison *et al.*, 2001; (13) Marten *et al.*, 1999; (14) Deeken *et al.*, 2000; (15) Gaymard *et al.*, 1998; (16) Ache *et al.*, 2000; (17) Reintanz *et al.*, 2002; (18) Mouline *et al.*, 2002

6.3 Daten zur funktionellen Charakterisierung der klonierten 6TM1P-Kaliumkanal- α -Untereinheiten

Kanal	K ⁺ -Aufnahme			Elektrophysiologische Analyse			
	E.c.	S.c.	andere	S.c.	X.l.	Sf9	andere
KAT1	+ (1)	+ (2, 3)	+ (X. l., 3)	+ (4, 5)	+ (6, 7)	+ (8, 9)	+ Tabak Protoplasten (10), CHO Zellen (11), <i>Arabidopsis</i> Sz (12, 13)
KAT2					+ (14)		
AKT1		+ (15)		+ (5)	- (16)	+ (8)	
AKT2/ AKT3	+ (1)	- (16)		- (16)	- (16) + (17, 18, 19)	- (16)	+ COS (20)
SKOR					+ (21, 22)		
GORK					+ (23)		
AtKC1					- (24)		
SPIK							+ COS (25)

Tabelle 6.2. Übersicht über die bisher klonierten *Shaker*-ähnlichen K⁺-Kanal- α -Untereinheiten aus *A. thaliana* und ihre funktionelle Charakterisierung in verschiedenen heterologen Expressionssystemen. Die Tabelle gliedert sich in die Spalten "Kanal" (die klonierten *Shaker*-ähnlichen Kaliumkanäle), "K⁺-Aufnahme" (Komplementationsstudien in entsprechenden Mutantenlinien) und "Elektrophysiologische Analyse" (*patch clamp*-Analyse der in heterologen Systemen exprimierten Kanalgene). Ein Pluszeichen (+) bezeichnet die nachgewiesene Funktionalität im jeweiligen Expressionssystem, ein Minuszeichen (-), daß dieser Nachweis nicht erbracht werden konnte. Die Expressionssysteme wurden wie folgt abgekürzt: CHO: *chinese hamster ovary* Zelllinie; COS: Makakken-Nieren Zelllinie; E.c.: *Escherichia coli*; S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*; X.l.: *Xenopus laevis* Oozyten; Sf9: Zelllinie aus *Spodoptera frugiperda*; Sz: Schließzellen (1) Uozumi *et al.*, 1998; (2) Anderson *et al.*, 1992; (3) Kochian *et al.*, 1993; (4) Bertl *et al.*, 1995; (5) Bertl *et al.*, 1997; (6) Schachtman *et al.*, 1992; (7) Véry *et al.*, 1995; (8) Gaymard *et al.*, 1996; (9) Marten *et al.*, 1996; (10) Bei und Luan, 1998; (11) Szabo *et al.*, 2000; (12) Ichida *et al.*, 1997; (13) Kwak *et al.*, 2001; (14) Pilot *et al.*, 2001; (15) Sentenac *et al.*, 1992; (16) Cao *et al.*, 1995; (17) Ketchum und Slayman, 1996; (18) Baizabal-Aguirre *et al.*, 1999; (19) Marten *et al.*, 1999; (20) Lacombe *et al.*, 2000; (21) Gaymard *et al.*, 1998; (22) Lacombe *et al.*, 2000; (23) Ache *et al.*, 2000; (24) Dreyer *et al.*, 1997; (25) Mouline *et al.*, 2002

[...] da William - mit seinen neuen Augengläsern - die Bücher nun lesen konnte, brach er bei jedem Titel, den er entdeckte, in mehr oder minder heftige Freudenschreie aus, sei's weil er das betreffende Werk bereits kannte oder weil er es seit langem suchte oder auch weil er noch niemals davon gehört hatte und daher um so erregter und wißbegieriger war.

7 Literatur

Die den einzelnen Kapiteln vorangestellten Motti sind entnommen: Umberto Eco, 1980, *Der Name der Rose*, Deutscher Taschenbuch Verlag, München (1. Auflage, 1986), in der Übersetzung von Burkhart Kroeber

Ache, P., D. Becker, N. Ivashikina, P. Dietrich, M. R. G. Roelfsema und R. Hedrich, 2000, GORK, a Delayed Outward Rectifier Expressed in Guard Cells of *Arabidopsis thaliana*, Is a K⁺-Selective, K⁺-Sensing Ion Channel, *FEBS Letters* (486) 93-98

Ache, P., D. Becker, R. Deeken, I. Dreyer, H. Weber, J. Fromm und R. Hedrich, 2001, VFK1, a *Vicia faba* K⁺ Channel Involved in Phloem Unloading, *Plant Journal* (27) 571-580

Aharon, G. S., A. Gnelli, W. A. Snedden und E. Blumwald, 1998, Activation of a Plant Plasma Membrane Ca²⁺ Channel by TG? 1, a Heterotrimeric G Protein ? -Subunit Homologue, *FEBS Letters* (424) 17-21

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, 1989, *Molecular Biology of The Cell*, Garland, New York, 2. Aufl.

An, Y. Q., J. M. McDowell, S. Huang, E. C. McKinney, S. Chambliss und R. B. Meagher, 1996, Strong, Constitutive Expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 Actin Subclass in Vegetative Tissues, *Plant Journal* (10) 107-121

Anderson, J. A., S. S. Huprikar, L. V. Kochian, W. J. Lucas und R. F. Gaber, 1992, Functional Expression of a Probable *Arabidopsis thaliana* Potassium Channel in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (89) 3736-3740

Armstrong, F., J. Leung, A. Grabov, J. Brearley, J. Giraudat und M. R. Blatt, 1995, Sensitivity to Abscissic Acid of Guard-Cell K⁺ Channels is Suppressed by *abi1-1*, a Mutant *Arabidopsis* Gene Encoding a Putative Protein Phosphatase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (92) 9520-9524

Baizabal-Aguirre, V. M., S. Clemens, N. Uozumi und J. I. Schroeder, 1999, Suppression of Inward-Rectifying K⁺ Channels KAT1 and AKT2 by Dominant Negative Point Mutations in the KST1 α -Subunit, *Journal of Membrane Biology* (167) 119-125

Bardy, N., A. Carrasco, J. P. Galaud, R. Pontlezica und H. Canut, 1998, Free-Flow Electrophoresis for Fractionation of *Arabidopsis thaliana* Membranes, *Electrophoresis* (19) 1145-1153

- Barry, P. H. and J. W. Lynch, 1991, Liquid Junction Potentials and Small Effects in Patch-Clamp Analysis, *Journal of Membrane Biology* (121) 101-117
- Basset, M., G. Conejero, M. Lepetit, P. Fourcroy und H. Sentenac, 1995, Organization and Expression of the Gene Coding for the Potassium Transport System AKT1 of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Molecular Biology* (29) 947-958
- Becker, D. 1995, *Zuordnung struktureller Motive eines Kaliumkanals aus Arabidopsis thaliana zu seinen Transporteigenschaften*, Dissertation, Universität Hannover
- Becker, D., I. Dreyer, S. Hoth, J. D. Reid, H. Busch, M. Lehnen, K. Palme und R. Hedrich, 1996, Changes in Voltage Activation, Cs⁺ Sensitivity, and Ion Permeability in H5 Mutants of the Plant K⁺ Channel KAT1, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (93) 8123-8128
- Bei, Q. X. und S. Luan, 1998, Functional Expression and Characterization of a Plant K⁺ Channel Gene in a Plant Cell Model, *Plant Journal* (13) 857-865
- Bennett, V. und L. Chen, 2001, Ankyrins and Cellular Targeting of Diverse Membrane Proteins to Physiological Sites, *Current Opinion in Cell Biology* (13) 61-67
- Berkowitz, G., X. Zhang, R. Mercier, Q. Leng und M. Lawton, 2000, Co-Expression of Calcium-Dependent Protein Kinase With the Inward Rectified Guard Cell K⁺ Channel KAT1 Alters Current Parameters in *Xenopus laevis* Oocytes, *Plant Cell Physiology* (41) 785-790
- Bernèche, S. und B. Roux, 2001, Energetics of Ion Conduction Through the K⁺ Channel, *Nature* (414) 73-77
- Bertl, A., J. A. Anderson, C. L. Slayman und R. F. Gaber, 1995, Use of *Saccharomyces cerevisiae* for Patch-Clamp Analysis of Heterologous Membrane Proteins: Characterization of KAT1, an Inward-Rectifying K⁺ Channel from *Arabidopsis thaliana*, and Comparison with Endogenous Yeast Channels and Carriers, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (92) 2701-2705
- Bertl, A., J. D. Reid, H. Sentenac und C. L. Slayman, 1997, Functional Comparison of Plant Inward-Rectifier Channels Expressed in Yeast, *Journal of Experimental Botany* (48) 405-413
- Blatt, M. R., 1992, K⁺ Channels of Stomatal Guard Cells: Characteristics of the Inward Rectifier and Its Control by pH, *Journal of General Physiology* (99) 615-644
- Blatt, M. R. und F. Armstrong, 1993, K⁺ Channels of Stomatal Guard Cells: Abscissic Acid-Evoked Control of the Outward Rectifier Mediated by Cytoplasmic pH, *Planta* (191) 330-341
- Bradford, M. M., 1976, A Rapid and Sensitive Method For the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry* (72) 248-254

- Brüggemann, L., P. Dietrich, I. Dreyer und R. Hedrich, 1999, Pronounced Differences Between the Native K^+ Channels and KAT1 and KST1 α -Subunit Homomers of Guard Cells, *Planta* (207) 370-376
- Butt, A. D., M. R. Blatt und C. C. Ainsworth, 1997, Expression, Evolution and Genomic Complexity of Potassium Ion Channel Genes of *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Plant Physiology* (150) 652-660
- Canut, H., J. Bauer und G. Weber, 1999, Separation of Plant Membranes by Electromigration Techniques, *Journal of Chromatography B* (722) 121-139
- Cao, Y., N. M. Crawford und J. I. Schroeder, 1995a, Amino Terminus and the First Four Membrane-Spanning Segments of the *Arabidopsis* K^+ Channel KAT1 Confer Inward-Rectification Property of Plant-Animal Chimeric Channels, *Journal of Biological Chemistry* (270) 17697-17701
- Cao, Y., J. M. Ward, W. B. Kelly, A. M. Ichida, R. F. Gaber, J. A. Anderson, N. Uozumi, J. I. Schroeder und N. M. Crawford, 1995b, Multiple Genes, Tissue Specificity, and Expression-Dependent Modulation Contribute to the Functional Diversity of Potassium Channels in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiology* (109) 1093-1106
- Cardon, G. H., M. Frey, H. Saedler und A. Gierl, 1993, Mobility of the Maize Transposable Element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal* (3) 773-784
- Clarkson D. T., 1993, Roots and the Delivery of Solutes to the Xylem, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* (341) 5-17
- Coetzee, W. A., Y. Amarillo, J. Chiu, A. Chow, D. Lau, T. McCormack, H. Moreno, M. S. Nadal, A. Ozaita, D. Pountney, M. Saganich, E. Vega-Saenz De Miera und B. Rudy, 1998, Molecular Diversity of K^+ Channels, *Annals of the New York Academy of Sciences* (868) 233-285
- Czempinski, K., S. Zimmermann, T. Ehrhardt und B. Müller-Röber, 1997, New Structure and Function in Plant K^+ Channels: KCO1, an Outward Rectifier with a Steep Ca^{2+} -Dependency, *EMBO Journal* (16) 2565-2575
- Daram, P., S. Urbach, F. Gaymard, H. Sentenac und I. Cherel, 1997, Tetramerization of the AKT1 Plant Potassium Channel Involves Its C-Terminal Cytoplasmic Domain, *EMBO Journal* (16) 3455-3463
- De Boer, A. H. und L. H. Wegner, 1997, Regulatory Mechanisms of Ion Channels in Xylem Parenchyma Cells, *Journal of Experimental Botany* (48) 441-449
- De Boer, A. H., 1999, Potassium Translocation Into the Root Xylem, *Plant Biology* (1) 36-45
- Deeken, R., C. Sanders, P. Ache und R. Hedrich, 2000, Developmental and Light-Dependent Regulation of a Phloem-Localised K^+ Channel of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal* (23) 285-290

- Dennison, K. L., W. R. Robertson, B. D. Lewis, R. E. Hirsch, M. R. Sussman und E. P. Spalding, 2001, Functions of AKT1 and AKT2 Potassium Channels Determined by Studies of Single and Double Mutants of *Arabidopsis*, *Plant Physiology* (127) 1012-1019
- Dietrich, P., I. Dreyer, P. Wiesner und R. Hedrich, 1998, Cation Sensitivity and Kinetics of Guard-Cell Potassium Channels Differ Among Species, *Planta* (205) 277-287
- Downey, P., I. Szabo, N. Ivashikina, A. Negro, F. Guzzo, P. Ache, R. Hedrich, M. Terzi und F. Lo Schiavo, 2000, KDC1, a Novel Carrot Root Hair K⁺ Channel - Cloning, Characterization, and Expression in Mammalian Cells, *Journal of Biological Chemistry* (275) 39420-39426
- Doyle, D. A., J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. L. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait und R. Mackinnon, 1998, The Structure of the Potassium Channel - Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity, *Science* (280) 69-77
- Dreyer, I., S. Antunes, T. Hoshi, B. Müller-Röber, K. Palme, O. Pongs, B. Reintanz und R. Hedrich, 1997, Plant K⁺ Channel α -Subunits Assemble Indiscriminately, *Biophysical Journal* (72) 2143-2150
- Ebel, J. und A. Mithöfer, 1998, Early Events in the Elicitation of Plant Defence, *Planta* (206) 335-348
- Ehrhardt, T., S. Zimmermann und B. Müller-Röber, 1997, Association of Plant K⁺_{in} Channels Is Mediated by Conserved C-Termini and Does Not Affect Subunit Assembly, *FEBS Letters* (409) 166-170
- Ehrhardt, T., 1998, *Protein-Protein-Interaktion und Expression einwärts gleichrichtender Kaliumkanäle aus Kartoffel (Solanum tuberosum L.)*, Dissertation, Freie Universität Berlin
- Emanuelsson, O., H. Nielsen, S. Brunak und G. Heijne, 2000, Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on Their N-Terminal Amino Acid Sequence, *Journal of Molecular Biology* (300) 1005-1016
- Epstein, E., D. W. Rains und O. E. Elzam, 1963, Resolution of Dual Mechanism of Potassium Absorption by Barley Roots, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (49) 684-692
- Fairley-Grenot, K. und S. M. Assmann, 1991, Evidence For G-Protein Regulation of Inward K⁺ Channel Current in Guard-Cells of Fava-Bean, *Plant Cell* (3) 1037-1044
- Feckler, C., 2000, *Analyse der Auxin-bindenden Proteine AtERabp1 aus Arabidopsis thaliana und ZmERabp1 aus Zea mays*, Dissertation, Universität zu Köln
- Felle, H. H., 2001, pH: Signal and Messenger in Plant Cells, *Plant Biology* (3) 577-591
- Ferrándiz, C., S. Pelaz und M. F. Yanofsky, 1999, Control of Carpel and Fruit Development in *Arabidopsis*, *Annual Reviews in Biochemistry* (68) 321-354

- Fromm, J. und W. Eschrich, 1989, Correlation of Ionic Movements With Phloem Unloading and Loading in Barley Leaves, *Plant Physiology and Biochemistry* (27) 577-585
- Fu, H. H. und S. Luan, 1998, AtKUP1 - a Dual-Affinity K⁺ Transporter from *Arabidopsis*, *Plant Cell* (10) 63-73
- Gaymard, F., M. Cerutti, C. Horeau, G. Lemailet, S. Urbach, M. Ravallec, G. Devauchelle, H. Sentenac und J. B. Thibaud, 1996, The Baculovirus/Insect Cell System as an Alternative to *Xenopus* Oocytes: First Characterization of the AKT1 K⁺ Channel from *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Biological Chemistry* (271) 22863-22870
- Gaymard, F., G. Pilot, B. Lacombe, D. Bouchez, D. Bruneau, J. Boucherez, N. Michauxferriere, J. B. Thibaud und H. Sentenac, 1998, Identification and Disruption of a Plant Shaker-Like Outward Channel Involved in K⁺ Release into the Xylem Sap, *Cell* (94) 647-655
- Gimpl, G., U. Klein, H. Reiländer und F. Fahrenholz, 1995, Expression of the Human Oxytocin Receptor in Baculovirus-Infected Insect Cells - High-Affinity Binding Is Induced by a Cholesterol Cyclodextrin Complex, *Biochemistry* (34) 13794-13801
- Godde, M., A. Tretyn, R. Uhl und K. Palme, 1999, Novel Tools for Elucidation of Gene Functions - an Array of Genetic and Microscopic Possibilities in Plant Physiology, in: M. Strnad, P. Pec und E. Beck (ed.) *Advances In Regulation Of Plant Growth And Development*, Peres Publishers, Prag, 7-22
- Goldstein, S. A. N., D. Bockenbauer, I. O'Kelly und N. Zilberg, 2001, Potassium Channels and the KCNK Family of Two-P-Domain Subunits, *Nature Reviews in Neuroscience* (2) 175-184
- Grabov, A. und M. R. Blatt, 1997, Parallel Control of the Inward-Rectifier K⁺ Channel by Cytosolic Free Ca²⁺ and pH in *Vicia* Guard Cells, *Planta* (201) 84-95
- Grignon, C. und H. Sentenac, 1991, pH and Ionic Conditions in the Apoplast, *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* (42) 103-128
- Gulbis, J. M., S. Mann und R. MacKinnon, 1999, Structure of a Voltage-Dependent K⁺ Channel γ -Subunit, *Cell* (97) 943-952
- Hanahan, D., 1983, Studies on Transformation of *Escherichia coli* With Plasmids, *Journal of Molecular Biology* (166) 557-580
- Hartung, W., J. W. Radin und D. L. Hendrix, 1988, Absciscic Acid Movement Into the Apoplastic Solution of Water-Stressed Cotton Leaves, *Plant Physiology* (86) 908-913
- Hedrich, R. und J. I. Schroeder, 1989, The Physiology of Ion Channels and Electrogenic Pumps in Higher Plant Cells, *Annual Reviews in Plant Physiology* (40) 539-569
- Hille, B., 1992, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates Inc., Sunderland (MA), 2. Aufl.

- Hirsch, R. E., B. D. Lewis, E. P. Spalding und M. R. Sussman, 1998, A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition, *Science* (280) 918-921
- Hodgkin, A. L. und B. Katz, 1949, The Effect of Sodium Ions on the Electrical Activity of the Giant Axon of the Squid, *Journal of Physiology* (108) 37-77
- Hoshi, T., 1995, Regulation of Voltage Dependence of the KAT1 Channel by Intracellular Factors, *Journal of General Physiology* (105) 309-328
- Hoth, S., I. Dreyer, P. Dietrich, D. Becker, B. Müller-Röber und R. Hedrich, 1997, Molecular Basis of Plant-Specific Acid Activation of K^+ Uptake Channels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (94) 4806-4810
- Hoth, S. und R. Hedrich, 1999, Distinct Molecular Bases for pH Sensitivity of the Guard Cell K^+ Channels KST1 and KAT1, *Journal of Biological Chemistry* (274) 11599-11603
- Hoth, S., D. Geiger, D. Becker und R. Hedrich, 2001, The Pore of Plant K^+ Channels Is Involved in Voltage and pH Sensing: Domain-Swapping Between Different K^+ Channel α -Subunits, *Plant Cell* (13) 943-952
- Huang, R. F., X. C. Wang und C. H. Lou, 2000, Cytoskeletal Inhibitors Suppress the Stomatal Opening of *Vicia faba* L. Induced by Fusicoccin and IAA, *Plant Science* (156) 65-71
- Hugnot, J. P., M. Salinas, F. Lesage, E. Guillemare, J. de Weille, C. Heurteaux, M. G. Mattei und M. Lazdunski, 1996, Kv8.1, a New Neuronal Potassium Channel Subunit With Specific Inhibitory Properties Towards Shab and Shaw Channels, *EMBO Journal* (15) 3322-3331
- Hwang, J. U., S. Suh, H. J. Yi, J. Kim und Y. Lee, 1997, Actin Filaments Modulate Both Stomatal Opening and Inward K^+ -Channel Activities in Guard Cells of *Vicia faba* L., *Plant Physiology* (115) 335-342
- Ichida, A. M. und J. I. Schroeder, 1996, Increased Resistance to Extracellular Cation Block by Mutation of the Pore Domain of the *Arabidopsis* Inward-Rectifying K^+ Channel KAT1, *Journal of Membrane Biology* (151) 53-62
- Ichida, A. M., Z. M. Pei, V. M. Baizabal-Aguirre, K. J. Turner und J. I. Schroeder, 1997, Expression of a Cs^+ -Resistant Guard Cell K^+ Channel Confers Cs^+ -Resistant, Light-Induced Stomatal Opening in Transgenic *Arabidopsis*, *Plant Cell* (9) 1843-1857
- Ivashikina, N., D. Becker, P. Ache, O. Meyerhoff, H. H. Felle und R. Hedrich, 2001, K^+ Channel Profile And Electrical Properties of *Arabidopsis* Root Hairs, *FEBS Letters*, (508) 463-469
- Jan, L. Y. und Y. N. Jan, 1997, Cloned Potassium Channels from Eukaryotes and Prokaryotes, *Annual Reviews in Neuroscience* (20) 91-123

- Jeschke, W. D. und J. S. Pate, 1991, Cation and Chloride Partitioning Through Xylem And Phloem Within the Whole Plant of *Ricinus communis* L. under Conditions of Salt Stress, *Journal of Experimental Botany* (42) 1105-1116
- Johnsson, N. und A. Varshavsky, 1994, Split Ubiquitin as a Sensor of Protein Interactions *in vivo*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (91) 10340-10344
- Joshi, C. P., 1987, An Inspection of the Domain Between Putative TATA Box and Translation Start Site in 79 Plant Genes, *Nucleic Acids Research* (15) 6643-6653
- Joshi, C. P., H Zhou, X. Huang und V. L. Chiang, 1997, Context Sequences of Translation Initiation Codon in Plants, *Plant Molecular Biology* (35) 993-1001
- Ketchum, K. A. und C. W. Slayman, 1996, Isolation of an Ion Channel Gene from *Arabidopsis thaliana* Using the H5 Signature Sequence from Voltage-Dependent K⁺ Channels, *FEBS Letters* (378) 19-26
- Kim, E. J., J. M. Kwak, N. Uozumi und J. I. Schroeder, 1998, AtKUP1 - an *Arabidopsis* Gene Encoding High-Affinity Potassium Transport Activity, *Plant Cell* (10) 51-62
- King, L. A., R. D. Possee, 1992, *The Baculovirus Expression System - A Laboratory Guide*, Chapman and Hall, London
- Kinraide, T. B., I. A. Newmann und B. Etherton, 1984, A Quantitative Simulation-Model For H⁺-Amino Acid Cotransport to Interpret the Effects of Amino-Acids on Membrane-Potential And Extracellular pH, *Plant Physiology* (76) 806-813
- Kochian, L. V. und W. J. Lucas, 1982, Potassium Transport in Corn Roots. I. Resolution of Kinetics Into a Saturable and Linear Component, *Plant Physiology* (70) 1723-1731
- Kochian, L. V. und W. J. Lucas, 1983, Potassium Transport in Corn Roots. II. The Significance of the Root Periphery, *Plant Physiology* (73) 208-215
- Kochian, L. V., J. Xin-Zhi und W. J. Lucas, 1985, Potassium Transport in Corn Roots. IV. Characterization of the Linear Component, *Plant Physiology* (79) 771-776
- Kochian, L. V. und W. J. Lucas, 1993, Can K⁺ Channels Do It All?, *Plant Cell* (5) 720-721
- Kochian, L. V., D. F. Garvin, J. E. Shaff, T. C. Chilcott und W. J. Lucas, 1993, Towards an Understanding of the Molecular Basis of Plants K⁺ Transport: Characterization of Cloned K⁺ Transport cDNAs, *Plant & Soil* 115-118
- Kooter, J., M. A. Matzke und P. Meyer, 1999, Listening to the Silent Genes: Transgene Silencing, Gene Regulation and Pathogen Control, *Trends in Plant Science* (4) 340-346
- Kozak, M., 1987, At Least Six Nucleotides Preceding the AUG Initiator Codon Enhance Translation in Mammalian Cells, *Journal of Molecular Biology* (196) 947-950

- Kozak, M., 1999, Initiation of Translation in Prokaryotes and Eukaryotes, *Gene*. (234) 187-208
- Kwak, J. M., Y. Murata, V. M. Baizabal-Aguirre, J. Merrill, M. Wang, A. Kemper, D. H. Scott, G. Tallman und J. I. Schroeder, 2001, Dominant Negative Guard Cell K⁺ Channel Mutants Reduce Inward-Rectifying K⁺ Currents and Light-Induced Stomatal Opening in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* (127) 473-485
- Lacombe, B., G. Pilot, E. Michard, F. Gaymard, H. Sentenac und J. B. Thibaud, 2000, A Shaker-Like K⁺ Channel with Weak Rectification Is Expressed in Both Source and Sink Phloem Tissues of *Arabidopsis*, *Plant Cell* (12) 837-851
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* (227) 680-685
- Lagarde, D., M. Basset, M. Lepetit, G. Conejero, F. Gaymard, S. Astruc und C. Grignon, 1996, Tissue-Specific Expression of *Arabidopsis* AKT1 Gene Is Consistent with a Role in K⁺ Nutrition, *Plant Journal* (9) 195-203
- Li, W. W. und S. M. Assmann, 1993, Characterization of a G-Protein-Regulated Outward K⁺ Current in Mesophyll-Cells of *Vicia faba* L., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (90) 262-266
- Li, J. X., Y. R. J. Lee und S. M. Assmann, 1998, Guard Cells Possess a Calcium-Dependent Protein Kinase That Phosphorylates the KAT1 Potassium Channel, *Plant Physiology* (116) 785-795
- Liman, E. R., J. Tytgat und P. Hess, 1992, Subunit Stoichiometry of a Mammalian K⁺ Channel Determined by Construction of Multimeric cDNAs, *Neuron* (9) 861-871
- Lohaus, G., H. Winter, B. Riens und H. W. Heldt, 1995, Further-Studies of the Phloem Loading Process in Leaves of Barley and Spinach - the Comparison of Metabolite Concentrations in the Apoplastic Compartment With Those in the Cytosolic Compartment and in the Sieve Tubes, *Botanica Acta* (108) 270-275
- Lux, S. E., K. M. John und V. Bennett, 1990, Analysis of Complementary DNA for Human Erythrocyte Ankyrin Indicates a Repeated Structure with Homology to Tissue Differentiation and Cell-Cycle Control Proteins, *Nature* (344) 36-42
- Maas, C., C. Reichel, J. Schell und H. H. Steinbiß, 1995, Preparation and Transformation of Monocot Protoplasts, *Methods in Cell Biology* (50) 383-399
- Maathuis, F. J. M. und D. Sanders, 1993, Energization of Potassium Uptake in *Arabidopsis thaliana*, *Planta* (191) 302-307
- Maathuis, F. J. M. und D. Sanders, 1994, Mechanism of High-Affinity Potassium Uptake in Roots of *Arabidopsis thaliana*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (91) 9272-9276

- Maathuis, F. J. M. und D. Sanders, 1995, Contrasting Roles in Ion Transport of Two K⁺-Channel Types in Root Cells of *Arabidopsis thaliana*, *Planta* (197) 456-464
- MacRobbie, E. A. C., 1997, Signalling in Guard Cells and Regulation of Ion Channel Activity, *Journal of Experimental Botany* (48) 515-528
- Marschner H., E. A. Kirkby und I. Cakmak, 1996, Effects of Mineral Nutritional Status On Shoot-Root Partitioning of Photoassimilates and Cycling of Mineral Nutrients, *Journal of Experimental Botany* (47) 1255-1263
- Marschner, H., E. A. Kirkby und C. Engels, 1997, Importance of Cycling and Recycling of Mineral Nutrients Within Plants for Growth and Development, *Botanica Acta* (110) 265-273
- Marten, I., F. Gaymard, G. Lemailet, J. B. Thibaud, H. Sentenac und R. Hedrich, 1996, Functional Expression of the Plant K⁺ Channel KAT1 in Insect Cells, *FEBS Letters* (380) 229-232
- Marten, I. und T. Hoshi, 1997, Voltage-Dependent Gating Characteristics of the K⁺ Channel KAT1 Depend on the N and C Termini, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (94) 3448-3453
- Marten, I. und T. Hoshi, 1998, The N-Terminus of the K⁺ Channel KAT1 Controls Its Voltage-Dependent Gating by Altering the Membrane Electric Field, *Biophysical Journal* (74) 2953-2962
- Marten, I., S. Hoth, R. Deeken, P. Ache, K. A. Ketchum, T. Hoshi und R. Hedrich, 1999, AKT3, a Phloem-Localized K⁺ Channel, Is Blocked by Protons, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (96) 7581-7586
- Martin, T., R. V. Wöhner, S. Hummel, L. Willmitzer und W. B. Frommer, 1992, The GUS Reporter System as a Tool to Study Plant Gene Expression, in: S. R. Gallagher (ed.), *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*, Academic Press Inc., San Diego, 23-43
- Mäser, P., S. Thomine, J. I. Schroeder, J. M. Ward, K. Hirschi, H. Sze, I. N. Talke, A. Amtmann, F. J. M. Maathuis, D. Sanders, J. F. Harper, J. Tchieu, M. Gribskov, M. W. Persans, D. E. Salt, S. A. Kim und M. L. Guerinot, 2001, Phylogenetic Relationships Within Cation Transporter Families of *Arabidopsis*, *Plant Physiology* (126) 1646-1667
- Mette, M. F., W. Aufsatz, J. van der Winden, M. A. Matzke und A. J. M. Matzke, 2000, Transcriptional Silencing and Promoter Methylation Triggered by Double-Stranded RNA, *EMBO Journal* (19) 5194-5201
- Millner, P. A., 2001, Heterotrimeric G-Proteins in Plant Cell Signaling, *New Phytologist* (151) 165-174

- Mollay, C., U. Vilas und G. Kreil, 1982, Cleavage of Honeybee Prepromelittin by an Endoprotease from Rat Liver Microsomes: Identification of Intact Signal Peptide, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (79) 2260-2263
- Morais-Cabral, J. H., Y. Zhou und R. MacKinnon, 2001, Energetic Optimization of Ion Conduction Rate by the K⁺ Selectivity Filter, *Nature* (414) 37-42
- Mori, I. C., N. Uozumi und S. Muto, 2000, Phosphorylation of the Inward-Rectifying Potassium Channel KAT1 by ABR Kinase in *Vicia* Guard Cells, *Plant & Cell Physiology* (41) 850-856
- Mouline, K., A. A. Véry, F. Gaymard, J. Boucherez, G. Pilot, M. Devic, D. Bouchez, J. B. Thibaud und H. Sentenac, 2002, Pollen Tube Development and Competitive Ability Are Impaired by Disruption of a Shaker K⁺ Channel in *Arabidopsis*, *Genes and Development* (16) 339-350
- Müller-Röber, B., J. Ellenberg, N. Provart, L. Willmitzer, H. Busch, D. Becker, P. Dietrich, S. Hoth und R. Hedrich, 1995, Cloning and Electrophysiological Analysis of KST1, an Inward Rectifying K⁺ Channel Expressed in Potato Guard Cells, *EMBO Journal* (14) 2409-2416
- Nakamura, R. L., W. L. McKendree, R. E. Hirsch, J. C. Sedbrook, R. F. Gaber und M. R. Sussman, 1995, Expression of an *Arabidopsis* Potassium Channel Gene in Guard Cells, *Plant Physiology* (109) 371-374
- Noble, M., S. A. Lewis und N. J. Cowan, 1989, The Microtubule Binding Domain of Microtubule-Associated Protein MAP1b Contains a Repeated Sequence Motif Unrelated to That of MAP2 and τ , *Journal of Cell Biology* (109) 3367-3376
- Numberger, M. und A. Draguhn, 1996, *Patch-Clamp-Technik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow, 1992, *Baculovirus Expression Vectors - A Laboratory Manual*, W. H. Freeman and Company, New York
- Palme, K., T. Hesse, N. Campos, C. Garbers, M. F. Yanofsky und J. Schell, 1992, Molecular Analysis of an Auxin Binding Protein Gene Located on Chromosome 4 of *Arabidopsis*, *Plant Cell* (4) 193-201
- Patel, A. J. und E. Honoré, 2001, Properties and Modulation of Mammalian 2P Domain K⁺ Channels, *Trends in Neuroscience* (24) 339-346
- Perozo, E., D. M. Cortes und L. G. Cuello, 1999, Structural Rearrangements Underlying K⁺-Channel Activation Gating, *Science* (285) 73-78

- Philippar, K., I. Fuchs, H. Lüthen, S. Hoth, C. S. Bauer, K. Haga, G. Thiel, K. Ljung, G. Sandberg, M. Böttger, D. Becker und R. Hedrich, 1999, Auxin-induced K⁺ Channel Expression Represents an Essential Step in Coleoptile Growth and Gravitropism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (96) 12186-12191
- Pilot, G., B. Lacombe, F. Gaymard, I. Cherel, J. Boucherez, J. B. Thibaud und H. Sentenac, 2001, Guard Cell Inward K⁺ Channel Activity in *Arabidopsis* Involves Expression of the Twin Channel Subunits KAT1 and KAT2, *Journal of Biological Chemistry* (276) 3215-3221
- Reimann, F. und F. M. Ashcroft, 1999, Inwardly Rectifying Potassium Channels, *Current Opinion in Cell Biology* (11) 503-508
- Reintanz, B., 1997, *Funktionelle Charakterisierung der Kaliumkanal-? -Untereinheit AtKC1 aus Arabidopsis thaliana*, Dissertation, Universität zu Köln
- Reintanz, B., A. Szyroki, N. Ivashikina, P. Ache, M. Godde, D. Becker, K. Palme und R. Hedrich, 2002, AtKC1, a Silent *Arabidopsis* Potassium Channel ? -Subunit Modulates Root Hair K⁺ Influx, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (99) 4079-4084
- Saalbach, G., G. Natura, W. Lein, P. Buschmann, I. Dahse, M. Rohrbeck und F. Nagy, 1999, The α -Subunit of a Heterotrimeric G-Protein from Tobacco, NtGP α 1, Functions in K⁺ Channel Regulation in Mesophyll Cells, *Journal of Experimental Botany* (50) 53-61
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich, 1988, Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA With a Thermostable DNA Polymerase, *Science* (239) 487-491
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor
- Schachtman, D. P., J. I. Schroeder, W. J. Lucas, J. A. Anderson und R. F. Gaber, 1992, Expression of an Inward-Rectifying Potassium Channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA, *Science* (258) 1654-1658
- Schachtman, D. P. und J. I. Schroeder, 1994, Cloning and Functional Mechanism of the High-Affinity Potassium Uptake Transporter From Higher Plant, *Nature* (370) 655-658
- Schachtman, D. P., 2000, Molecular Insights into the Structure and Function of Plant K⁺ Transport Mechanisms, *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* (1465) 127-139
- Schönknecht, G., P. Spoormaker, R. Steinmeyer, L. Brüggeman, P. Ache, R. Dutta, B. Reintanz, M. Godde, R. Hedrich und K. Palme, 2002, KCO1 is a Component of the Slow-Vacuolar (SV) Ion Channel, *FEBS Letters* (511) 28-32

- Schroeder, J. I., J. M. Ward, W. und Grassmann, 1994, Perspectives on the Physiology and Structures of Inward-Rectifying K^+ Channels in Higher Plants: Biophysical Implications for K^+ Uptake, *Annual Review in Biophysics and Biomolecular Structure* (23) 441-471
- Sedgwick, S. G. und S. J. Smerdon, 1999, The Ankyrin Repeat: A Diversity of Interactions on a Common Structural Framework, *Trends in Biochemical Sciences* (24) 311-316
- Sentenac, H., N. Bonneaud, M. Minet, F. Lacroute, J. M. Salmon, F. Gaymard und C. Grignon, 1992, Cloning and Expression in Yeast of a Plant Potassium Ion Transport System, *Science* (256) 663-665
- Smart, C. J., D. F. Garvin, J. P. Prince, W. J. Lucas und L. V. Kochian, 1996, The Molecular Basis of Potassium Nutrition in Plants, *Plant & Soil* (187) 81-89
- Smyth, D. R., J. L. Bowman und E. M. Meyerowitz, 1990, Early Flower Development in *Arabidopsis*, *Plant Cell* (2) 755-767
- Spalding, E. P., R. E. Hirsch, D. R. Lewis, Z. Qi, M. R. Sussman und B. D. Lewis, 1999, Potassium Uptake Supporting Plant Growth in the Absence of AKT1 Channel Activity - Inhibition by Ammonium and Stimulation by Sodium, *Journal of General Physiology* (113) 909-918
- Spoormaker, P., 1998, *Charakterisierung von Kaliumkanalproteinen in Arabidopsis thaliana*, Dissertation, Universität zu Köln
- Szabo, I., A. Negro, P. M. Downey, M. Zoratti, F. Lo Schiavo und G. M. Giacometti, 2000, Temperature-Dependent Functional Expression of a Plant K^+ Channel in Mammalian Cells, *Biochemical & Biophysical Research Communications* (274) 130-135
- Szyroki, A., N. Ivashikina, P. Dietrich, M. R. G. Roelfsema, P. Ache, B. Reintanz, R. Deeken, M. Godde, H. Felle, R. Steinmeyer, K. Palme und R. Hedrich, 2001, KAT1 Is Not Essential for Stomatal Opening, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (98) 2917-2921
- Talbott, L. D. und E. Zeiger, 1996, Central Roles for Potassium and Sucrose in Guard-Cell Osmoregulation, *Plant Physiology* (111) 1051-1057
- Talbott, L. D. und E. Zeiger, 1998, The Role of Sucrose in Guard Cell Osmoregulation, *Journal of Experimental Botany* (49) 329-337
- Tang, H., A. C. Vasconcelos und G. A. Berkowitz, 1995, Evidence That Plant K^+ Channel Proteins Have Two Different Types of Subunits, *Plant Physiology* (109) 327-330
- Tang, H. X., A. C. Vasconcelos, J. Ma und G. A. Berkowitz, 1998, In Vivo Expression Pattern of a Plant K^+ Channel β Subunit Protein, *Plant Science* (134) 117-128
- Tang, X. D., I. Marten, P. Dietrich, N. Ivashikina, R. Hedrich und T. Hoshi, 2000, Histidine(118) in the S2-S3 Linker Specifically Controls Activation of the KAT1 Channel Expressed in *Xenopus* Oocytes, *Biophysical Journal* (78) 1255-1269

- Tessier, D. C., D. Y. Thomas, H. E. Khouri, F. Laliberte und T. Vernet, 1991, Enhanced Secretion from Insect Cells of a Foreign Protein Fused to the Honeybee Melittin Signal Peptide, *Gene* (98) 177-183
- Tester, M. und R. A. Leigh, 2001, Partitioning of Nutrient Transport Processes in Roots, *Journal of Experimental Botany* (52) 445-457
- Tucker, S. J., F. M. Gribble, C. Zhao, S. Trapp und F. M. Ashcroft, 1997, Truncation of Kir6.2 Produces ATP-Sensitive K⁺ Channels in the Absence of the Sulphonylurea Receptor, *Nature* (387) 179-183
- Ullah, H., J. G. Chen, J. C. Young, K. H. Im, M. R. Sussman und A. M. Jones, 2001, Modulation of Cell Proliferation by Heterotrimeric G Protein in *Arabidopsis*, *Science* (292) 2066-2069
- Uozumi, N., T. Nakamura, J. I. Schroeder und S. Muto, 1998, Determination of Transmembrane Topology of an Inward-Rectifying Potassium Channel from *Arabidopsis thaliana* Based on Functional Expression in *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (95) 9773-9778
- Urbach, S., I. Cherel, H. Sentenac und F. Gaymard, 2000, Biochemical Characterization of the *Arabidopsis* K⁺ Channels KAT1 and AKT1 Expressed or Co-Expressed in Insect Cells, *Plant Journal* (23) 527-538
- Van Bel, A. J. E., 1993, Strategies of Phloem Loading, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* (44) 253-281
- Vancanneyt, G., R. Schmidt, A. O'Connor-Sanchez, L. Willmitzer und M. Rocha-Sosa, 1990, Construction of an Intron-Containing Marker Gene: Splicing of the Intron in Transgenic Plants and Its Use in Monitoring Early Events in *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation, *Molecular and General Genetics* (220) 245-250
- Very, A. A., F. Gaymard, C. Bosseux, H. Sentenac und J. B. Thibaud, 1995, Expression of a Cloned Plant K⁺ Channel in *Xenopus* Oocytes - Analysis of Macroscopic Currents, *Plant Journal*. (7) 321-332
- Vieira, J. und J. Messing, 1982, The pUC plasmids, an M13mp7-Derived System for Insertion Mutagenesis and Sequencing With Synthetic Universal Primers, *Gene* (19) 259-268
- Vranová, E., S. Tähtiharju, R. Sriprang, H. Willekens, P. Heino, E. T. Palva, D. Inzé und W. Van Camp, 2001, The AKT3 Potassium Channel Protein Interacts With the AtPP2CA Protein Phosphatase 2C, *Journal of Experimental Botany* (52) 181-182
- Walker, D. J., R. A. Leigh und A. J. Miller, 1996, Potassium Homeostasis in Vacuolate Plant Cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (93) 10510-10514

- Wang, X. Q., H. Ullah, A. M. Jones und S. M. Assmann, 2001, G Protein Regulation of Ion Channels and Absciscic Acid Signaling in *Arabidopsis* Guard Cells, *Science* (292) 2070-2072
- Weber, W.-M., 1999, Ion Currents of *Xenopus laevis* Oocytes: State of the Art, *Biochimica et Biophysica Acta* (1421) 213-233
- Wegner, L. H. und A. H. De Boer, 1997, Two Inward K^+ Channels in the Xylem Parenchyma Cells of Barley Roots Are Regulated by G-Protein Modulators Through A Membrane-Delimited Pathway, *Planta* (203) 506-516
- Welch, R. M. und E. Epstein, 1968, The Dual Mechanism of Alkali Cation Absorption by Plant Cells: Their Parallel Operation Across The Plasmalemma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (61) 447-453
- White, P. J., 1997, The Regulation of K^+ Influx Into Roots of Rye (*Secale cereale* L.) Seedlings by Negative Feedback Via the K^+ Flux From Shoot to Root in the Phloem, *Journal of Experimental Botany* (48) 2063-2073
- Wisman, E., G. H. Cardon, P. Fransz und H. Saedler, 1998, The Behaviour of the Autonomous Maize Transposable Element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana* Allows Efficient Mutagenesis, *Plant Molecular Biology* (37) 989-999
- Wolff, P., 1999, *Genetische Analysen als Beiträge zum Verständnis der Spaltöffnungsbewegung in Arabidopsis thaliana. I. Auxininduzierte Genexpression in Schließzellen. II. Isolierung und Charakterisierung der für mutmaßliche Ionentransporter kodierende Gene AtCNBT1 und AtCNBT2*, Dissertation, Universität zu Köln
- Wu, W. H. und S. M. Assmann, 1994, A Membrane-Delimited Pathway of G Protein Regulation of the Guard-Cell Inward K^+ Channel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (91) 6310-63154
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing, 1985, Improved M-13 Phage Cloning Vectors and Host Strain Nucleotide Sequence of the M-13mp-18 and pUC-19 Vectors, *Gene* (33) 103-119
- Zei, P. C. und R. W. Aldrich, 1998, Voltage-Dependent Gating of Single Wild-Type and S4 Mutant KAT1 Inward Rectifier Potassium Channels, *Journal of General Physiology* (112) 679-713
- Zerangue, N., B. Schwappach, Y. N. Jan und L. Y. Jan, 1999, A New ER Trafficking Signal Regulates the Subunit Stoichiometry of Plasma Membrane K_{ATP} -Channels, *Neuron* (22) 537-548
- Zerangue, N., Y. N. Jan und L. Y. Jan, 2000, An Artificial Tetramerization Domain Restores Efficient Assembly of Functional Shaker Channels Lacking T1, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (97) 3591-3595

- Zhang, X. A., J. O. Ma und G. A. Berkowitz, 1999, Evaluation of Functional Interaction between K^+ Channel α - and β -Subunits and Putative Inactivation Gating by Co-Expression in *Xenopus laevis* Oocytes, *Plant Physiology* (121) 995-1002
- Zimmermann, S., I. Talke, T. Ehrhardt, G. Nast und B. Müller-Röber, 1998, Characterization of SKT1, an Inwardly Rectifying Potassium Channel from Potato, by Heterologous Expression in Insect Cells, *Plant Physiology* (116) 879-890
- Zimmermann, S., S. Hartje, T. Ehrhardt, G. Plesch und B. Müller-Röber, 2001, The K^+ Channel SKT1 is Co-Expressed With KST1 in Potato Guard Cells - Both Channels Can Co-Assemble Via Their Conserved K_T Domains, *Plant Journal* (28) 517-527

Danksagung

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von August 1997 bis Oktober 2001 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Palme am Max-Delbrück-Laboratorium in der Max-Planck-Gesellschaft in Köln durchgeführt

Herrn Prof. Palme gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Besonders bedanken möchte ich mich für die Betreuung dieser Arbeit, die gewährten Freiheiten in der Forschung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Mein Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. S. Waffenschmidt und Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge für ihre Bereitschaft zur Gutachtertätigkeit. Des weiteren Herrn Prof. Dr. R. Strey für die Übernahme des Vorsitzes bei der Disputation.

Ich bin all denen zu Dank verpflichtet, die durch die Überlassung von Materialien und die Bereitstellung verschiedener Techniken maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen haben, namentlich Prof. Dr. H. Canut (CNRS, Toulouse; FFE-Fraktionen), Prof. Dr. U.-I. Flügge und Dr. F. Gröner (Universität zu Köln; AtKC1 Δ_N 52), Dr. H. Reiländer (MPI für Biophysik, Frankfurt a. M.; MelFLAG-Plasmid), Dr. E. Wisman und Dr. K. Dekker (AMAZE, bzw. ZIGIA, MPI für Züchtungsforschung, Köln; *En-1*-mutagenisierte Pflanzenlinien), Frau M. Kalda (MPIZ, Köln; diverse Photoarbeiten). Besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. R. Hedrich (Institut für Botanik I, Universität Würzburg) und die Mitarbeiter seines Arbeitskreises für die freundliche Aufnahme und die wunderbare und produktive Arbeitsatmosphäre, besonders erwähnen möchte ich: Dr. Peter Ache, Dr. Dirk Becker, Dr. Rosalia Deeken, Dr. Petra Dietrich, Matthias Dziony, Dietmar Geiger, Dr. Stefan Hoth, Dr. Natalia Ivashikina, Oliver Meyerhoff und Dr. Katrin Phillipar.

Ich danke allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Frau Dr. Petra Cirpus für ihre freundliche Hilfsbereitschaft beim Erlernen neuer Techniken

Frau Petra Tänzler und Frau Michaela Lehnen für ihre hervorragende Hilfe bei vielen Experimenten

Frank Eikermann für die exzellente Betreuung der Gewächshausarbeiten

Weiterhin möchte ich mich bei den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern des Arbeitskreises Palme bedanken, die durch ihre immerwährende Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie die gute Zusammenarbeit zu dieser Arbeit beigetragen haben, namentlich: Filipa Alexandra "Party Chicken" Carvalho dos Santos, Dr. Tinka Eneva, Dr. Jiri Friml, Dr. Eva Frimlova, Dr. Leo Gälweiler, Claudia Gilles, Dr. Debora Grosskopf-Kreuer, Dr. Changhui Guan, Jan Hejatko, Christiane Horst, Dr. Stefan Jakobs, Dr. Juliette Leymarie, Elisabeth Luley, Dr. João Marques, Dr. Arthur Molendijk, Dr. Andreas Müller, Dr. Gerhard Muster, Dr. Klaus Nettesheim, Iris Ottensschläger, Maria Piques, Dr. Chadavalada Rajendrakumar, Dr. David Rouquié, Mario Schelhaas, Dr. Robert Schuurink, Dr. Ralf Stracke, Dr. Thomas Teichmann, Olaf Tietz, Dr. Lars Vahlkamp

Herzlich danke ich Herrn Dr. Matthias Godde für seine profunde Einführung in die elektrophysiologischen Techniken und die inspirierenden Diskussionen.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Patricia Wolff, Dr. Christian "Der QIAbiker" Feckler und Dr. Frieder Bischoff für viele kritische Anmerkungen zu dieser Arbeit bedanken - und manches darüber hinaus.

Zu besonderem Dank bin ich Frau Dr. Birgit Reintanz verpflichtet, für alles, was ich von ihr gelernt habe. Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und stetige Unterstützung trugen wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit bei.

Meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, möchte ich an dieser Stelle nochmals für ihre Liebe, ihr unerschütterliches Vertrauen und ihren Zuspruch danken.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß die Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist; sowie, daß ich eine Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der geltenden Prüfungsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Priv.-Doz. Dr. S. Waffenschmidt betreut worden.

Teilpublikationen:

Szyroki, A., N. Ivashikina, P. Dietrich, M. R. G. Roelfsema, P. Ache, B. Reintanz, R. Deeken, M. Godde, H. Felle, R. Steinmeyer, K. Palme und R. Hedrich, 2001, KAT1 Is Not Essential for Stomatal Opening, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (98) 2917-2921

Reintanz, B., A. Szyroki, N. Ivashikina, P. Ache, M. Godde, D. Becker, K. Palme und R. Hedrich, 2002, AtKC1, a Silent *Arabidopsis* Potassium Channel α -Subunit Modulates Root Hair K^+ Influx, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (99) 4079-4084

Köln, den 28. März 2002

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Lokalisation und Funktionsanalyse der Kaliumkanal- α -Untereinheiten AtKC1 und KAT2 aus *Arabidopsis thaliana*.

Westernblot-Analysen wiesen AtKC1 ausschließlich in der Plasmamembran-Fraktion nach. Die apparente molekulare Masse von nativem AtKC1 von etwa 76 kDa entspricht der theoretisch vorhergesagten. In heterologen Expressionssystemen (Sf9-Zellen und BY2-Tabaksuspensionszellen) lag AtKC1 ebenso wie verschiedene Deletions- und Fusionskonstrukte ausschließlich im ER vor und konnte daher nicht elektrophysiologisch untersucht werden. Aus einer *En-1*-mutagenisierten Population wurde die *footprint*-Mutante Atkc1-f isoliert, in der die Expression von AtKC1 vollständig unterdrückt war. Es wurden keine phänotypischen Änderungen beobachtet, die auf den AtKC1-*knockout* zurückgeführt werden könnten. Die *patch clamp*-Analyse an Wurzelhaar-Protoplasten von Atkc1-f im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen ergab eine Änderung der Öffnungskinetik, eine invertierte pH-Abhängigkeit sowie eine Erhöhung der Rb⁺-Sensitivität und die Kanalinhibierung durch Ca²⁺.

Die vollständige KAT2-cDNA wurde aus Pflanzen isoliert, die den genomischen KAT2-Klon unter Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors überexprimierten. Die Expression in Sf9-Zellen und *X. laevis* Oozyten zur elektrophysiologischen Analyse ergab, daß KAT2 für einen spannungsabhängigen, einwärtsgerichtenden Kaliumkanal mit hoher Selektivität für Kalium gegenüber anderen Kationen (K⁺ >> Rb⁺ > NH₄⁺ > Na⁺ ~ Li⁺) kodiert. Der KAT2-vermittelte K⁺-Strom wird durch niedrige extrazelluläre wie cytosolische pH-Werte erhöht und durch Cs⁺ blockiert. Unter Verwendung von Promotor-GUS-Pflanzen konnte die Aktivität des KAT2-Promotors ubiquitär in jungen Keimlingen nachgewiesen werden, wobei die Färbung in der Wurzel mit dem Alter zurückgeht. In Blüten zeigte sich Promotoraktivität in Narbe, Griffel und apikalem Ovar, in der entwickelten Schote nur in der Abscissionszone.

Abstract

This thesis is concerned in the localization and functional analysis of the potassium channel α -subunits AtKC1 and KAT2 from *Arabidopsis thaliana*.

Western blot analyses detected AtKC1 exclusively in the plasma membrane fraction. The apparent molecular mass of native AtKC1 of about 76 kDa corresponds to the calculated of 75.6 kDa. AtKC1, as well as various deletion and fusion constructs, were located in the ER in heterologous expression systems (Sf9 cells and tobacco BY2 suspension cells) and could therefore not be analyzed by electrophysiological means. From an *En-1* mutagenized population the footprint mutant Atkc1-f, in which AtKC1 expression was completely inhibited, was isolated. No phenotypic alterations, which could be ascribed to the AtKC1 knockout, were observed. By comparison to wildtype plants patch clamp analysis on roothair protoplasts from Atkc1-f plants demonstrated a change in opening kinetics, an inverted pH-dependence as well as an increase in Rb^{+} -sensitivity and channel inhibition by Cs^{+} .

The complete KAT2 cDNA was isolated from plants overexpressing the genomic KAT2 clone under the control of the *CaMV* 35S promoter. KAT2 expression in Sf9 cells and *X. laevis* oocytes showed that it codes for a voltage-dependent, inward-rectifying potassium channel with high selectivity for potassium over other cations ($K^{+} \gg Rb^{+} > NH_4^{+} > Na^{+} \sim Li^{+}$). KAT2 mediated K^{+} currents are increased by low extracellular and cytosolic pH values and blocked by Cs^{+} . Using promoter-GUS plants KAT2-promoter activity was detected ubiquitously in young seedlings with decreasing staining intensity in the root over time. In flowers promoter activity was shown in stigma, style and the apical ovary and in the developed silique at the abscission zone.

